

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification 6 : A01N 1/02, A61L 2/08, A61M 1/38, A61K 41/00, H01J 37/20, G01N 21/64		A1	(11) International Publication Number: WO 95/12973 (43) International Publication Date: 18 May 1995 (18.05.95)
(21) International Application Number: PCT/US94/12764 (22) International Filing Date: 3 November 1994 (03.11.94) (30) Priority Data: 08/150,940 10 November 1993 (10.11.93) US (71) Applicant: STERITECH, INC. [US/US]; Suite 300, 2525 Stanwell Drive, Concord, CA 94520 (US). (72) Inventors: CIMINO, George, D.; 4839 Full Moon Drive, Richmond, CA 94803 (US). SIMMS, Romilly, John; 4153 Interdale Way, Palo Alto, CA 94306 (US). (74) Agents: CARROLL, Peter, G. et al; Steritech, Inc., Suite 300, 2525 Stanwell Drive, Concord, CA 94520 (US).			(81) Designated States: AU, CA, JP, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Published With international search report.
(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR PHOTOACTIVATION			
(57) Abstract <p>Methods and compositions are described for treating contaminants in material intended for <u>in vivo</u> use, and in particular blood and blood products for human use. Contaminants in blood cell preparations are inactivated prior to long term storage and transfusion. Inactivation is accomplished using a device having a unique temperature control design.</p>			

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平9-511152

(43) 公表日 平成9年(1997)11月11日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I
A 6 1 L 2/08		7108-4C	A 6 1 L 2/08
A 0 1 N 1/02		7508-4H	A 0 1 N 1/02
A 6 1 K 35/14		9283-4C	A 6 1 K 35/14 Z
A 6 1 L 2/02		7108-4C	A 6 1 L 2/02 Z
2/16		7108-4C	2/16 Z

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 54 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-513908
 (86) (22) 出願日 平成6年(1994)11月3日
 (85) 翻訳文提出日 平成8年(1996)5月10日
 (86) 国際出願番号 PCT/US94/12764
 (87) 国際公開番号 WO95/12973
 (87) 国際公開日 平成7年(1995)5月18日
 (31) 優先権主張番号 08/150, 940
 (32) 優先日 1993年11月10日
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AU, CA, JP

(71) 出願人 ステリテック, インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国 94520 カリフォルニア
 州 コンコルド, スタンウェル ドライ
 ブ, 2525番地 スイート 300
 (72) 発明者 チミノ, ジョージ ディー,
 アメリカ合衆国 94803 カリフォルニア
 州 リッチモンド, フル ムーン ドライ
 ブ 4839番地
 (72) 発明者 シムズ, ロミリー ジョン
 アメリカ合衆国 94306 カリフォルニア
 州 バロ アルト, インターデイル ウェ
 イ 4153番地
 (74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

(54) 【発明の名称】 光活性化のための装置および方法

(57) 【要約】

In vivo使用を目的とした物質中に含まれる汚染物を処理するための方法および組成物が開示される。血液細胞製剤中の汚染物は長期保存および輸血に先立って不活化される。不活化は特殊な温度制御設計を有する装置を使って行われる。

【特許請求の範囲】

1. 血液製剤中の病原体を不活化するための光活性化装置であって、

a) ハウジング；

b) 該ハウジング内に収容された、少なくとも1つの光反応性化合物の活性化を起こさせるための、320～400nmの波長の電磁放射線を提供する手段；

c) 活性化の間、該放射線提供手段から一定の距離で光反応性化合物を含む複数の血液バッグを支持するための、該ハウジング内の、下部紫外線透過プレートアセンブリー（この上に血液バッグを載せることができる）を含む手段；および

d) 下部プレートアセンブリーの上に配置された、上部紫外線透過プレートアセンブリー（上記の上部および下部プレートアセンブリーは、照射中に該ハウジングの外側の空気との有意な交換から遮断されたチャンネルを規定しており、その中に血液バッグを冷却するための空気を循環させることができる）；

を含んでなる光活性化装置。

2. 下部プレートアセンブリーが頂部および底部プレートと、その頂部および底部プレート間の空気循環室を含み、該空気循環室と該チャンネルとの空気交換を可能にすべく該空気循環室が該チャンネルに連通している、請求項1に記載の光活性化装置。

3. a) 上記の放射線提供手段を冷却するための、該ハウジング内にそれに隣接して配置された、外側から該ハウジングを通して放射線提供手段と上記プレートアセンブリーの間に空気を送り出す手段を含む第1の温度維持手段；および

b) 1) 該ハウジング内に存在する空気から熱を吸収するための、上記プレートアセンブリー間の熱交換器、および

2) 該熱交換器に固定された関係で配置された空気循環手段、

を含む、冷却した空気を空気循環室および該チャンネルを通して循環させるための、該ハウジング内に配置された第2の温度維持手段；

をさらに含む、請求項2に記載の光活性化装置。

4. 温度制御液体を入れたり出したりできるように、上記の熱交換器が入口と出口をもつ導管を含む、請求項3に記載の光活性化装置。
5. 上部および下部プレートアセンブリーが約1~10cm離れている、請求項1に記載の光活性化装置。
6. 血液バッグを下部プレートアセンブリーの上に載せたとき、上部プレートアセンブリーが、閉じた際に、血液バッグと接触しない、請求項5に記載の光活性化装置。
7. 下部プレートアセンブリーが6個の血液バッグを支持するのに十分な寸法のものである、請求項1に記載の光活性化装置。
8. 上記の血液バッグ支持手段が血液バッグに連結された複数の付属品を位置づけるための手段をさらに含み、かくして、該連結部は血液バッグへの放射線の強度を有意に低下させることがない、請求項7に記載の光活性化装置。
9. 付属品を位置づけるための手段が血液バッグへまたは血液バッグから血液製剤を移すためのチューブ、および血液製剤保存バッグを取容することができる、請求項8に記載の光活性化装置。
10. 照射中の血液バッグに含まれるサンプルを混合するための、上記の血液バッグ支持手段に隣接して配置された、血液バッグ支持手段を揺動させる手段をさらに含む、請求項1に記載の光活性化装置。
11. 下部プレートアセンブリーが揺動中の血液バッグの位置を維持するための隆起部(うね)のある上面を有する、請求項10に記載の光活性化装置。
12. 上記のハウジングが電磁放射線を遮断する材料でできており、使用者は活性化の際の電磁放射線から防護される、請求項1に記載の光活性化装置。
13. 放射線提供手段を制御するための手段をさらに含む、請求項1に記載の光活性化装置。
14. 放射線提供手段を制御する手段が、
 - a) 放射線提供手段の回りに配置された、電磁放射線を測定するための複数の検知器；および
 - b) 該検知器により測定された放射線の希望の出力で放射線提供手段を止める、該検知器に接続されたフィードバック制御；

を含む、請求項13に記載の光活性化装置。

15. 放射線提供手段により提供される放射線の強度が少なくとも $1 \text{ mW}/\text{cm}^2$ である、請求項1に記載の光活性化装置。

16. 放射線提供手段が約 400 nm の長波長カットオフを有する、請求項1に記載の光活性化装置。

17. 上部および下部プレートアセンブリーが、上記の電磁放射線を濾光して約 320 nm の短波長カットオフを与える材料でできている、請求項1に記載の光活性化装置。

18. 放射線提供手段が光源の頂部バンクおよび底部バンクを含み、頂部バンクが上部プレートアセンブリーの上に、そして底部バンクが下部プレートアセンブリーの下に置かれている、請求項1に記載の光活性化装置。

19. 光源の頂部バンクと底部バンクに隣接して、血液バッグ支持手段の方へ光源からの電磁放射線を反射するための反射手段をさらに含む、請求項18に記載の光活性化装置。

20. 光反応性化合物を処理するための光活性化装置であって、

a) 不透明のハウジング；

b) 該ハウジング内に収容された、少なくとも1つの光反応性化合物の活性化を起こさせるための、 $320 \sim 400 \text{ nm}$ の波長の電磁放射線を提供する手段；

c) 活性化の間、放射線提供手段から一定の距離で複数の血液バッグを支持するための、該ハウジング内の、下部紫外線透過プレートアセンブリー（この上に血液バッグを載せることができる）を含む手段；

d) 下部プレートアセンブリーの上に配置された、上部紫外線透過プレートアセンブリー（上記の上部および下部プレートアセンブリーは、照射中に該ハウジングの外側の空気との有意な交換から遮断されたチャンネルを規定しており、それを通して血液バッグを冷却するための空気を循環させることができる）；

e) 放射線提供手段を冷却するための、該ハウジング内にそれに隣接して配置された、外側から該ハウジングを通して放射線提供手段と上記プレートアセ

ンプリーの間に空気を送り出す手段を含む第1の温度維持手段；および

f) 該ハウジング内に存在する空気から熱を吸収するための、上記プレートアセンブリー間の熱交換器と、該熱交換器に固定された関係で配置された空気循環手段とを含む、冷却した空気を該チャンネルを通して循環させるための、該ハウジング内に配置された第2の温度維持手段；

を含んでなる光活性化装置。

21. 温度制御液体を入れたり出したりできるように、上記の熱交換器が入口と出口をもつ導管を含む、請求項20に記載の光活性化装置。

22. 下部プレートアセンブリーが頂部および底部プレートと、その頂部および底部プレート間の空気循環室を含む、請求項20に記載の光活性化装置。

23. 空気循環手段が空気循環室を通して空気を循環させる、請求項22に記載の光活性化装置。

24. 上部および下部プレートアセンブリーが約1～10cm離れている、請求項20に記載の光活性化装置。

25. 血液バッグを下部プレートアセンブリーの上に載せたとき、上部プレートアセンブリーが、閉じた際に、血液バッグと接触しない、請求項24に記載の光活性化装置。

26. 下部プレートアセンブリーが6個の血液バッグを支持するのに十分な寸法のものである、請求項20に記載の光活性化装置。

27. 上記の血液バッグ支持手段が血液バッグに連結された複数の付属品を位置づけるための手段をさらに含み、かくして、該連結部は血液バッグへの放射線の強度を有意に低下させることがない、請求項26に記載の光活性化装置。

28. 付属品を位置づけるための手段が血液バッグへまたは血液バッグから血液製剤を移すためのチューブ、および血液製剤保存バッグを収容することができる、請求項27に記載の光活性化装置。

29. 照射中の血液バッグに含まれるサンプルを混合するための、上記の血液バッグ支持手段に隣接して配置された、血液バッグ支持手段を揺動させる手段をさらに含む、請求項20に記載の光活性化装置。

30. 下部プレートアセンブリーが揺動中の血液バッグの位置を維持するための隆

起部（うね）のある上面を有する、請求項29に記載の光活性化装置。

31. 放射線提供手段を制御するための手段をさらに含む、請求項20に記載の光活性化装置。

32. 放射線提供手段を制御する手段が、

a) 放射線提供手段の回りに配置された、電磁放射線を測定するための複数の検知器；および

b) 該検知器により測定された放射線の希望の出力で放射線提供手段を停止させる、該検知器に接続されたフィードバック制御；

を含む、請求項31に記載の光活性化装置。

33. 放射線提供手段により提供される放射線の強度が少なくとも $1 \text{ mW}/\text{cm}^2$ である、請求項20に記載の光活性化装置。

34. 放射線提供手段が約 400 nm の長波長カットオフを有する、請求項20に記載の光活性化装置。

35. 上記のプレートアセンブリーが電磁放射線から血液製剤に損傷を与える放射線の波長を取り除く材料でできている、請求項20に記載の光活性化装置。

36. 上記の材料が電磁放射線を濾光して約 320 nm の短波長カットオフを与える、請求項35に記載の光活性化装置。

37. 放射線提供手段が光源の頂部バンクおよび底部バンクを含み、頂部バンクが上部プレートアセンブリーの上に、そして底部バンクが下部プレートアセンブリーの下に置かれている、請求項20に記載の光活性化装置。

38. 光源の頂部バンクと底部バンクに隣接して、血液バッグ支持手段の方へ光源からの電磁放射線を反射するための反射手段をさらに含む、請求項37に記載の光活性化装置。

39. 光反応性化合物を光活性化する方法であって、

a) 電磁放射線の蛍光源から一定の距離で、1種またはそれ以上の光反応性化合物を含む複数の血液バッグを維持し；

b) 複数の血液バッグに、同時に、該蛍光源からの約 320 nm の波長カットオフを有する電磁放射線を照射して、少なくとも1つの光反応性化合物の活性化を起こさせ；

c) 空気を冷却し、冷却した空気を密閉系内の血液バッグのまわりに循環させることによって、活性化の間中血液バッグの温度をほぼ室温に維持する；

ことを含んでなる方法。

40. 電磁放射線の蛍光源が血液バッグに $1 \text{ mW} / \text{cm}^2$ より大きい電磁放射線の強度を送達する、請求項39に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

光活性化のための装置および方法

発明の分野

本発明は、一般に、新規および既知の化合物を光活性化するための装置および方法に関するものである。

背景

輸血を必要とするレシピエントのためにボランティアのドナーから集めた全血は、通常その成分ごとに、すなわち赤血球、血小板、および血漿に分別される。これらの画分はそれぞれ別個に保存されて、多くの特殊な症状および病気の治療に用いられる。例えば、赤血球成分は貧血の治療に、濃厚血小板成分は出血の制御に、そして血漿成分は血友病を治療するための血液凝固VIII因子の供給源として頻繁に用いられている。

理想的には、すべての血液細胞製剤は採血したばかりの血液から調製して、直ちにレシピエントに輸血されるべきである。しかしながら、大部分のケースでは血液供給センターを運営する後方業務のためにこの可能性が阻まれている。輸血は昼夜を問わず必要とされるが、異常な時間帯に血液を提供してくれるドナーを手配することは、不可能でないにしても困難である。その結果、現在の血液供給センターは保存血液製剤を使用しなければならない。

米国では、血液保存処置が政府による規制を受けている。特に、これらのシステムで集められた血液成分の最大保存期間を規定している。例えば、“開放”（つまり、滅菌してない）システムで集められた全血成分は、政府規約のもとで、24時間以内に、大抵の場合は6～8時間以内に輸血しなければならない。対照的に、“密閉”（つまり、滅菌してある）システムで全血成分を集めた場合は、赤血球は（用いる抗凝血剤および保存媒体の種類に応じて）最高42日間保存することができ、血漿はさらに長期間凍結保存してもよいことになっている。

マーフィー (Murphy) とガードナー (Gardner) は、New Eng. J. Med. 280:

1094(1969)において、血小板濃縮血漿 (PRP) として22℃で保存した血小板が4℃で保存したものよりも良好なin vivo半減期を有することを実証した。か

くして、室温での保存後に、より許容される血小板濃厚液を輸血することができた。最近まで、規約によって血小板濃厚液は（保存容器の型に応じて）最高7日間の室温での保存が許されていた。ところが、7日経過した血小板濃厚液を用いると、バクテリアの増殖やレシピエントのその後の輸血反応の発生率が許容できないレベルにまで増加することが認められた。こうして、現在では、血小板濃厚液は5日間しか保存することができない。

血小板濃厚液製剤に用いられる血液バッグは、連結している付随バッグと同様に、それ自体が滅菌されている。従って、血小板を濃縮するのに必要な操作の間中血液製剤を無菌状態に保つことは比較的簡単なことであると考えられるかもしれない。しかしながら、バクテリアは少なくとも2つの異なる方法によって侵入する。まず第一に、ドナーが軽い菌血症にかかっている場合、その血液は採血方法や保存方法の如何にかかわらず汚染されてしまう。適格なドナーの経歴調査と身体検査によりこの問題を軽減できるだろうが、排除することはできない。グロスマン(B.J. Grossman)ら, *Transfusion* 31:500 (1991) を参照されたい。第二に、より広まっている汚染源は静脈穿刺である。たとえ皮膚の“殺菌”を行っても、汗腺や毛嚢のまわりの陰窩を殺菌することは極めて難しい。静脈穿刺の間に、この汚染された皮膚がしばしば鋭い針で小さい“コア”として切り取られる。このコアが血液バッグにバクテリアを“植えつける”ように働き、バクテリアを増殖させてレシピエントに危険を及ぼすことがある。

実際、血小板の輸血を必要としている多くの患者は、化学療法や基礎的な血液病のために、バクテリアの正常な浄化および破壊のための宿主防御機構を欠いている。保存血小板中に含まれる、見たところでは無害なように思える微生物の増殖でさえ、レシピエント反応および死をもたらすことがある。例えば、ミーレ(B.A. Myhre *JAMA* 244:1333 (1980) およびヒール(J.M. Heal)ら, *Transfusion* 27:2 (1987) を参照されたい。

血小板の汚染度を検査する報告は、それらの方法、サンプル量、およびバクテリアの検出系が異なっていた。ブッホルツ(D.H. Buchholz)ら, *Transfusion*

13:268 (1973) は、多数(>1000バッグ)のサンプルを試験し、かつバクテ

リアの培養のために十分な手段を講じた場合に、2.4%の総血小板汚染レベルを報告した。一部のユニットがちょうど24時間の保存後にひどく汚染されていたが、全体としての出現率は濃厚液の保存期間により変化し、個々のユニットをプールすることが広範囲に実施されるにつれて増加した(30%以上のプールが3日で汚染された)。ブッホルツ(D.H. Buchholz)ら, New Eng. J. Med. 285:429(1971)も参照されたい。他の臨床医はより少ない数を提起しているが、最近の研究は敗血症性血小板輸血が実際よりかなり低く報告されていることを示している。例えば、モロウ(J.F. Morrow)ら, JAMA 266:555(1991)を参照されたい。

血小板を前培養することはバクテリアの汚染問題の解決策とはならない。培養アッセイで増殖を検査するには48時間かかる。アッセイ結果を待つために血小板ユニットをさらに2日間保持することは、皮肉にも、安全性の限界をさらに狭めることになる。モロウ(J.F. Morrow)ら, JAMA 266:555 (1991) 中の表2を参照されたい。汚染のひどいユニットは開始時に検出されるが、汚染の軽いユニットは2日間増殖させる必要がある。最後には、より古い、汚染の可能性のより大きいユニットが輸血されるはめになる。

血液細胞を(例えば、食塩水で)洗浄すること、あるいはバクテリアを濾過することも実際的な解決策ではない。これらの技法は時間がかかり、しかも輸血に利用できる生存血液細胞の数を減らしてしまうので非効率的である。最も重要な点として、それらは一般に貯蔵システムへの“参加”を必要とする。一旦密閉システムに参加しても、そのシステムは“開放”と見なされ、そして最初の場所での血液の採集および加工方法にかかわりなく、すぐに輸血を行わねばならない。

抗生物質も理にかなった解決策ではない。汚染は広範囲の微生物から生じる。抗生物質はこの範囲をカバーする必要がある。多くのレシピエントは抗生物質にアレルギーを示す。さらに、失活されない薬剤耐性バクテリア株の数が次第に増加している。

最近、ブソラレンのような光反応性化合物を用いて血液中の病原体を失活させることに関心がもたれている。ブソラレンはフラン環とクマリンとの線縮合により形成される三環式化合物である。ブソラレンは二本鎖核酸の塩基対の間に入っ

て、長波長紫外線(UVA)の吸収によりピリミジン塩基との共有結合付加物を形成することができる。シミノ(G.D. Cimino)ら, *Ann. Rev. Biochem.* 54:1151 (1985) およびハースト(Hearst)ら, *Quart. Rev. Biophys.* 17:1(1984)を参照されたい。プソラレン-ピリミジンの一付加物に隣接して反対鎖に第2のピリミジンが存在すると、第2の光子の吸収により鎖間架橋として機能する二付加物が形成される。イサックス(S.T. Isaacs)ら, *Biochemistry* 16:1058 (1977) ; イサックス(S.T. Isaacs)ら, *Trends in Photobiology* (Plenum) pp. 279-294 (1982) ; テスマン(J. Tessman)ら, *Biochem.* 24:1669 (1985) ; ハースト(Hearst)ら, 米国特許第4,124,589号, 同第4,169,204号および同第4,196,281号を参照されたい(参考としてここに組み入れる)。

プソラレンはいくつかの血液製剤に含まれるウイルスを失活することが知られている。アルター(H.J. Alter)ら, *The Lancet* (ii:1446) (1988) ; リン(L. Lin)ら, *Blood* 74:517 (1989) ; ヴィーゼハーン(G.P. Wieseahn)ら, 米国特許第4,727,027号および同第4,748,120号を参照されたい(参考としてここに組み入れる)。これらの文献は8-メトキシプソラレン(8-MOP)と照射との併用を記載している。それらは、 $300\mu\text{g}/\text{ml}$ の8-MOPが1時間またはそれ以上の紫外線照射との併用によりウイルスを効果的に失活し得ることを示している。しかしながら、これらの処理条件はエネルギー転移のため血液製剤に害を及ぼす。これらのアプローチは、酸素分子の濃度を制限することによって細胞への損傷が特に抑制されているときだけ実行可能であるが、かかるプロセスは厄介で費用がかかる。

イソプソラレンは、プソラレン同様、フラン環とクマリンとの縮合により形成される三環式化合物である。バチチェッティ(Baccichetti)ら, 米国特許第4,312,883号、ボーディン(F. Bordin)ら, *Experientia* 35:1567(1979)、ダル・アクア(F. Dall'Acqua)ら, *Medecine Biologie Envir.* 9:303 (1981)、カフィエリ(S. Caffieri)ら, *Medecine Biologie Envir.* 11:386(1983)、ダル・アクアら, *Photochem Photobio.* 37:373 (1983)、ギオット(G. Guiotto)ら, *Eur. J. Med. Chem-Chim. Ther.* 16:489 (1981)、ダル・アクアら, *J. Med. Chem.* 24:178 (1984)を参照されたい。プソラレンと違って、イソプソラレンの

環は線状環形ではない。二本鎖核酸の塩基対の間に入って、長波長紫外線の吸収により核酸塩基との共有結合付加物を形成することができるが、イソプソラレンは、そのかどのある幾何学的形状ゆえに、普通はDNAとの架橋を形成しない。一般的には、シミノ(G.D. Cimino)ら, *Ann. Rev. Biochem.* 54:1151 (1985) を参照されたい。

現在、プソラレンや他の光活性化化合物を活性化するための紫外線を発生する装置が用いられている。ハースト (Hearst) への米国特許第5,184,020号は、このようなプソラレン光活性化装置を記述している。しかし、この装置はチューブのような容器に入ったサンプルの照射に適する構造をしている。それは血液バッグでの使用に適する装置を開示していない。さらに、この特許は照射したサンプルの冷却システムを記述しているが、このシステムはサンプル容器を取り囲んでいる流体の循環に依存するので血液バッグには使えないだろう。

その他の装置はプソラレンの活性化には適していないが、血液バッグとともに他の目的に使用することができる。例えば、ミリポール(Miripol)への米国特許第4,726,949号および第4,866,282号は、同種異系免疫の予防に使えるような照射装置を記述している。この装置は滅菌のために大量の血液を処理する試験所での使用には実際に役立たない。この装置は1個の血液容器を支持するにすぎず、このことが血液処理の障害となっている(ミリポールの上記特許の図1, ref. no. 10参照)。さらに、それは核酸が放射線を吸収して損傷を受ける恐れのある313バンド(上記'282特許の請求項1参照)を含む280~320ナノメートルの波長の放射線を与える。UVB範囲は血小板の機能も破壊することがある。ミリポールの特許は、UV-A範囲源は「リンパ球の同種異系免疫作用の良好な軽減をもたらさない」と述べている(上記'949特許の第2欄、第61~64行参照)。最後に、ミリポールの特許は、照射中にそのシステムを冷却するためのただ1つの手段である排気ファンの使用を開示している。これらの特許の目的は31℃以下の熱を維持することにある(第3欄、第44~46行参照)。しかし、血小板は現在22~24℃で保存されている。スタック(G. Stack) およびスニダー(L. Snyder), "Storage of Platelet Concentrate", *Blood Separation and Platelet Fractionation*, pp. 9-125 (1991 Wiley-Liss, Inc.) を参照されたい。

最後に、ブソラレンの活性化にも血液製剤への他の使用にも適していないと思われる装置が開示されている。ヘラルド (Hero^{ld}) への米国特許第4,421,987号は、歯科用部品の漂白処理のための、400~500 nmのスペクトル範囲の放射線を用いる歯科用物体の照射装置を記述している。この装置にはランプにより発せられる全放射線から所望のスペクトル範囲にあるスペクトル部分(約400~500 nm)だけを反射して、この所望のスペクトル範囲外にある部分を透過または通過させる選択的リフレクターが設置されている。この装置には温度制御システムも付いており、このシステムは送風機と吸収フィルター(リフレクターと同様に、所望のスペクトル範囲外にある放射線を取り除く)を併用するものである。この装置は光汚染除去処理の本目的には適していない。なぜならば、それは一部の血液成分に損傷を与える波長を使用し、同時に光反応性化合物の活性化に必要な波長を取り除くように設計されているからである。さらに、それは血液サンプルの温度を損傷を防止するように十分低く維持する温度維持システムを備えていない。

要約すると、血液バッグのような密閉システムでの使用にかなう方法で、保存および輸血に先立って血液成分中のバクテリアを失活させる手段を開発する必要がある。このアプローチは、温度を効率よく制御しかつ血液製剤または輸血のレシピエントに害を及ぼすことなく、抗容量の血液およびさまざまな生物を取り扱えるものでなければならない。

発明の概要

本発明は、新規および公知の化合物を光活性化する装置および方法に関する。本発明は、さらに、新規および公知の化合物を核酸に結合させる装置も意図する。詳細には、本発明は、血液の被る病原体に結合し、これを不活化するように新規および公知の化合物を光活性化する装置を意図する。本発明によれば、微生物による汚染を処理するために、核酸結合化合物が選択的に採用される。

ひとつの態様において、本発明は以下のものを意図する。血液製剤中の病原体を不活化するための光活性化装置であって、ハウジング；該ハウジング内に収容された、少なくとも一つの光反応性化合物の活性化を起こさせるための、電磁放

射線を提供する手段；活性化の間、該放射線提供手段から一定の距離で光反応性化合物を含む複数の血液バッグを支持するための、該ハウジング内の、下部紫外線透過プレートアセンブリー（この上に血液バッグを載せることができる）を含む手段；および、該下部プレートアセンブリーの上に配置された、上部紫外線透過プレートアセンブリー（上記の上部および下部プレートアセンブリーは、照射中に該ハウジングの外側の空気との有意な交換から遮断されたチャンネルを規定しており、その中に血液バッグを冷却するための空気を循環させることができる）を含んでなる前記の光活性化装置。もう一つの態様において、下部プレートアセンブリーは、頂部および底部プレートと、その頂部および底部プレート間の空気循環室を含み、該空気循環室とチャンネルとの間で空気交換を可能にすべく該空気循環室が該チャンネルに連通している。

ある好ましい態様において、上記の装置は、放射線提供手段を冷却するための、ハウジング内にそれに隣接して配置された、外側から該ハウジングを通して該放射線提供手段とプレートアセンブリーの間に空気を送り出す手段を含む第1の温度維持手段；および、該ハウジング内に存在する空気から熱を吸収するための、上記プレートアセンブリー間の熱交換器、および該熱交換器に固定された関係で配置された空気循環手段を含む、冷却した空気を空気循環室およびチャンネルを通して循環させるための、該ハウジング内に配置された第2の温度維持手段をさらに含む。一つの態様において、熱交換器は、温度制御液体を入れたり出したりできるように、入口と出口をもつ導管を含む。ある好ましい態様において、上部

および下部プレートアセンブリーは、約1～10cm離れている。しかしながら、血液バッグを下部プレートアセンブリーの上に載せたとき、上部プレートアセンブリーは該血液バッグと接触しないことが好ましい。

迅速なプロセッシングのために、一つの意図された態様において、下部プレートアセンブリーは、6個の血液バッグを支持するのに十分な寸法のものである。血液バッグ支持手段は、血液バッグに連結された複数の付属品を位置づけるための手段をさらに含んでもよく、かくして、該付属品は血液バッグへの放射線の強度

を有意に低下させることがない。このような付属品を位置づけるための手段としては、血液バッグへまたは血液バッグから血液製剤を移すためのチューブ、および血液製剤保存バッグを挙げることができる。上記の装置は、照射中の血液バッグに含まれるサシブルを混合するための、血液バッグ支持手段に隣接して配置された、血液バッグ支持手段を揺動させる手段をさらに含んでもよい。本発明は、下部プレートアセンブリーが揺動中の血液バッグの位置を維持するための隆起部（うね）のある上面を有することを意図する。

ある好ましい態様において、ハウジングは、電磁放射線を遮断する材料でできしており、使用者は活性化の際の電磁放射線から防護される。また、放射線提供手段を制御するための手段が意図されるが、これは、該放射線提供手段の回りに配置された、電磁放射線を測定するための複数の検知器；および、該検知器により測定された放射線の希望の出力で該放射線提供手段を止める、該検知器に接続されたフィードバック制御を含んでもよい。好ましくは、放射線提供手段により提供される放射線の強度は少なくとも $15 \text{ mW} / \text{cm}^2$ であり、放射線提供手段は 400 ナノメートル以上の高端波長カットオフを有する。さらに、上部および下部プレートアセンブリーは、電磁放射線を濾光して 320 ナノメートル以下の低端波長カットオフを与える材料でできていることが意図される。

放射線提供手段は、光源の頂部バンクおよび底部バンクをさらに含んでもよく、該頂部バンクが上部プレートアセンブリーの上に、そして該底部バンクが下部プレートアセンブリーの下に置かれている。光源の頂部バンクと底部バンクに隣接した反射手段も意図されるが、これは血液バッグ支持手段の方へ光源からの電磁放射線を反射する。

本発明の別の態様において、光反応性化合物を処理するための光活性化装置であって、不透明のハウジング；該ハウジング内に収容された、少なくとも1つの光反応性化合物の活性化を起こさせるための電磁放射線を提供する手段；活性化の間、該放射線提供手段から一定の距離で複数の血液バッグを支持するための、該ハウジング内の、下部紫外線透過プレートアセンブリー（この上に血液バッグを載せることができる）を含む手段；該下部プレートアセンブリーの上に配置さ

れた、上部紫外線透過プレートアセンブリー（上記の上部および下部プレートアセンブリーは、照射中に該ハウジングの外側の空気との有意な交換から遮断されたチャンネルを規定しており、それを通して血液バッグを冷却するための空気を循環させることができる）；上記の放射線提供手段を冷却するための、該ハウジング内にそれに隣接して配置された、外側から該ハウジングを通して上記の放射線提供手段と上記のプレートアセンブリーの間に空気を送り出す手段を含む第1の温度維持手段；および、該ハウジング内に存在する空気から熱を吸収するための、上記プレートアセンブリー間の熱交換器と、該熱交換器に固定された関係で配置された、冷却した空気を該熱交換器から該チャンネルを通して循環させるための空気循環手段とを含む、冷却した空気を該チャンネルを通して循環させるための、該ハウジング内に配置された第2の温度維持手段を含んでなる前記の光活性化装置が意図される。ひとつの態様において、熱交換器は、温度制御液体を入れたり出したりできるように、入口と出口をもつ導管を含む。下部プレートアセンブリーは、頂部および底部プレートと、その頂部および底部プレート間の空気循環室を含んでもよい。この態様において、空気循環手段は、空気循環室を通して空気を循環させる。

上部および下部プレートアセンブリーは、約1～10cm離れていることが意図される。しかしながら、ある好ましい態様において、血液バッグを下部プレートアセンブリーの上に載せたとき、上部プレートアセンブリーは血液バッグと接触しない。また、6個の血液バッグを支持するのに十分な寸法の下部プレートアセンブリーが意図される。血液バッグ支持手段が血液バッグに連結された複数の付属品を位置づけるための手段をさらに含み、かくして、該付属品は血液バッグへの放射線の強度を有意に低下させないことが意図される。そのような付属品の

あるものは、血液バッグへまたは血液バッグから血液製剤を移すためのチューブ、および血液製剤保存バッグを含む。本発明は、さらに、照射中の血液バッグに含まれるサンプルを混合するための、血液バッグ支持手段に隣接して配置された、血液バッグ支持手段を揺動させる手段を意図する。ひとつの態様において、下部プレートアセンブリーは、揺動中の血液バッグの位置を維持するための隆起部

(うね)のある上面を有する。

本発明は、放射線提供手段を制御するための手段を含む光活性化装置を意図する。放射線提供手段を制御する手段は、放射線提供手段の回りに配置された、電磁放射線を測定するための複数の検知器；および、該検知器により検出された放射線の希望の出力で該放射線提供手段を停止させる、該検知器に接続されたフィードバック制御を含んでよい。ある好ましい態様において、放射線提供手段により提供される放射線の強度は少なくとも 15 mW/cm^2 であり、放射線提供手段は 400 ナノメートル以上の高端波長カットオフを有する。

ひとつの態様において、プレートアセンブリーは、電磁放射線から血液製剤に損傷を与える放射線の波長を取り除く材料でできている。特に、上記の材料は、電磁放射線を濾光して 320 ナノメートル以下の低端波長カットオフを与えることが意図される。また、放射線提供手段は、光源の頂部バンクおよび底部バンクを含み、該頂部バンクが上部プレートアセンブリーの上に、そして該底部バンクが下部プレートアセンブリーの下に置かれていることが意図される。反射手段が、光源の頂部バンクと底部バンクに隣接して配置されてもよく、これは、血液バッグ支持手段の方へ光源からの電磁放射線を反射する。

本発明は、また、光反応性化合物を光活性化する方法であって、電磁放射線の蛍光源から一定の距離で、1種またはそれ以上の光反応性化合物を含む複数の血液バッグを維持し；複数の該血液バッグに、同時に、該蛍光源からの約 320 nm の波長カットオフを有する電磁放射線を照射して、少なくとも1つの該光反応性化合物の活性化を起こさせ；空気を冷却し、冷却して空気を密閉系内の該血液バッグのまわりに循環させることによって、活性化の間、該血液バッグの温度をほぼ室温に維持することを含んでなる前記の方法を意図する。好ましくは、電磁放射線の蛍光源は、血液バッグに 1 mW/cm^2 より大きい電磁放射線の強度を

送達する。

図面の説明

図1は、閉じられた状態にある、本発明装置の一態様の透視図である。

図2は、開けられた状態にある、図1に示した装置の線2-2に沿った断面図

である。

図3は、図1に示した装置の線3-3に沿った断面図である。

図4は、図1に示した装置の線4-4に沿った断面図である。

図5は、特に血液製剤に適用される本発明の汚染除去アプローチを図式的に示す。

図6は、核酸への8-メトキシプソラレンの光付加を示すグラフである。

図7は、HPLCで測定したときの4'-アミノメチル-4,5',8-トリメチルプソラレン (AMT) の分解に対する8-メトキシプソラレン (8-MOP) の分解を示すグラフである。

発明の説明

本発明は、新規化合物及び既知化合物を光活性化するための装置及び方法に関する。

前述のように、全血は採血後に典型的には赤血球、血小板、及び血漿に分別される。これら各画分は、*in vivo*使用に先立って特殊な条件下で別個に貯蔵される。多くの場合、汚染度は増殖のために貯蔵期間に関係してくる。採血時に微生物を不活性化する方法は貯蔵中の増殖を防止すると考えられる。

表1. 光反応性化合物

アクチノマイシン類
 アントラシクリノン類
 アントラマイシン
 ベンゾジピロン類
 フルオレン類及びフルオレノン類
 フロクマリン類
 マイトマイシン
 モノストラール・ファースト・ブルー
 ノルフィリンA
 具体的に挙げはしないが多くの有機染料
 フェナントリジン類
 フェナザチオニウム塩類
 フェナジン類
 フェノチアジン類
 フェニルアジド類
 キノリン類
 チアキサントネン類

“光活性化合物”（又は“光反応性化合物”）とは、電磁放射線に応答して化学変化を受ける化合物のファミリー（表1）を規定するものである。本明細書に記載する光反応性化合物の1種は、広くフロクマリン類と言われている。これらフロクマリン類は、次の2つの主要なカテゴリーに属する。つまり、1) プソラ

レン類〔7H-フロ(3,2-g)-(1)-ベンゾピラン-7-オン、又は6-ヒドロキシ-5-ベンゾフランアクリル酸の δ -ラクトン〕、これらは線状であって、中央の芳香族基に付いている2つの酸素残基が1,3方向を有しており、そして更にフラン環基が2環クマリン系の6位に連結している、及び2) イソプソラレン類〔2H-フロ(2,3-h)-(1)-ベンゾピラン-2-オン、又は4-ヒドロキシ-5-ベンゾフランアクリル酸の δ -ラクトン〕、これらは折れ曲がっており、中央の芳香族基に付いている2つの酸素残基が1,3方向を

有しており、そして更にフラン環基が2環クマリン系の8位に連結している。ブソラレン誘導体は、線状フロクマリンの3,4,5,8,4'又は5'位における置換から誘導され、イソブソラレン誘導体は、折れ曲がったフロクマリンの3,4,5,6,4'又は5位における置換から誘導される。

1つの態様においては、本発明は分別後であるが貯蔵前に血液製剤を不活性化することを意図している。この態様では、微生物による汚染を処理するために核酸結合性化合物が選択的に用いられる。

1つの態様においては、この核酸結合性化合物はフロクマリン類を含む群から選ばれる。好ましい態様では、このフロクマリンはブソラレン又はイソブソラレンである。

本発明の不活性化法は、単細胞および多細胞の生物、特にバクテリア、真菌、マイコプラズマおよび原生動物を不活性化する方法を提供する。従来法とは対照的に、本発明の方法は血液製剤に害を及ぼさない。細胞への有意な損傷が見られず、それ故酸素分子の濃度を制限する必要がない。

本発明は、これまで用いられた濃度より遙かに低い濃度の核酸結合性化合物を使用することを意図している。例えば、本発明では $30\mu\text{g}/\text{ml}$ またはそれ未満の濃度で8-MOPを使用することを意図している。実際に、血小板濃縮物中のバクテリア汚染除去にとって好ましい8-MOPの濃度は $3\mu\text{g}/\text{ml}$ またはそれ未満、即ちヴィーゼハーン(G.P. Wieseahn)ら(前掲)により使用された濃度より100倍低い濃度である。

更に、本発明は、以前に記載された照射線量より遙かに低い線量を使用することを意図している。このことは、より低い強度の放射線源、波長カットオフフィ

ルター(下記参照)および/またはより短い照射時間により達成される。好ましい態様においては、照射時間は可変的であるが、1秒から99分までの間で1秒の増分で調整される。

本発明を不活性化の理論によって制限するつもりはないが、より低い化合物濃度および照射線量を使用することは、本発明を単細胞や多細胞の(ウイルスに対する)汚染除去に適用する場合、より低いレベルの核酸結合で不活性化が達成さ

れるだろう、という認識から出発している。更に、不活性化は完全である必要はないという認識がある。言い換えると、生育可能部分が貯蔵期間内に疾患を起こすのに十分なレベルにまで増殖できない限りは、部分的な不活性化で十分であろう。

。具体的な例を挙げることが、どのような場合にも不活性化法が完全な不活性化を達成しても達成しなくてもよいことを理解するのに役立つ。バクテリアの培養では、新たな培養プレートに移して増殖させたとき、培養物のアリコートがある一定の期間後に検出不能であれば、滅菌されたと言える。この期間および増殖条件（例えば、温度）が“増幅ファクター”を規定する。この増幅ファクターはその検出法（例えば、バクテリアコロニーの外観についての培養プレートの目視検査）の限界とともにその不活性化法の感度を規定する。シグナルを検出可能にするために最小数の生育可能バクテリアをプレートに播かなければならない。最適な検出法では、この最小数は1個のバクテリア細胞である。最適さが劣る検出法では、シグナルを認められるようにするために播かれるバクテリア細胞の最小数は1よりずっと大きくなり得る。この検出法では“限界値”が決められ、限界値以下ではその方法は完全に有効であると考えられる（実際、限界値以上ではこの方法は部分的に有効であるに過ぎない）。

アッセイの増幅ファクターとその検出法が規定する限界値との相互関係を説明することができる。例えば、バクテリア細胞をプレートに播き、検出法として目視検査を任意に選択する。増殖条件および期間は 10^4 の全体増殖が起こるようなものであると仮定する。検出可能なシグナルは増幅後に現実に存在するバクテリア細胞の数に比例するでだろう。計算のために、検出限界値を 10^6 細胞とする。 10^6 より少ない細胞しか増幅後に存在しないなら、細胞のコロニーを目視で検出することができず、この不活性化法は有効と考えられよう。 10^4 の増幅

ファクターおよび 10^6 の検出限界値であると仮定すると、感度限界は1000のバクテリア細胞となろう。 1000 より少ない生育可能バクテリア細胞がこの滅菌法を行った後のバクテリア培養物のもとのアリコート中に存在するならば、その培養物は依然として滅菌されていると考えられよう。

このような状況がバクテリアの増殖アッセイでは一般的である。アッセイの感度は、生きているバクテリア細胞が存在するのにそれらをそのアッセイでは検出できないような感度である。このことで、少なくとも部分的に、血液製剤のバクテリア汚染の程度を測定しようとした研究者により得られた結果のバラツキを説明できる。ブッホルツ(D.H. Buchholz)ら、Transfusion 13:268 (1973) を参照されたい。そこには、そのようなバラツキが論じられている。

多くの国では、細胞性生物による血液製剤の汚染がウイルスによる汚染よりも広まっているためより重大であることに注目すべきである。例えば、南アメリカにおいては、最も重要な血液由来の生物はT. cruziがあり、これはシャーガス病(Chagas disease)の病因である。南アメリカでは約1600~1800万人の人々(チリの人口の11%を含む)が感染している。本発明の汚染除去法はこの原生動物の不活性化に十分に適すると考えられる。

本発明は、光活性化のための装置及び方法、具体的には光反応性核酸結合性化合物の活性化のための装置および方法を意図している。本発明は1つのユニットに統合される電磁放射線の安価な線源を有する装置を意図している。一般的には、本発明は、a) 少なくとも1つの光反応性化合物を活性化させるのに適切な波長の電磁放射線を供給する手段；b) 活性化の間、該電磁放射線供給手段から固定された距離で複数の血液製剤を支持する手段；及びc) 活性化の間、該血液製剤の温度を所望の温度範囲内に維持する手段；を含む光反応性化合物を処理するための光活性化装置を意図している。また、本発明は、a) 電磁放射線の蛍光源から固定された距離で1又は2以上の光反応性化合物を含有する複数の血液製剤容器を支持し；b) 該複数の血液製剤に同時に前記電磁放射線を照射して少なくとも1つの光反応性化合物を活性化させ；そしてc) 活性化の間、該血液製剤の温度を所望の温度範囲内に維持する；ことを含む方法も意図している。

本発明は、光活性化のための装置及び方法、具体的には光反応性化合物の活性

化により血液製剤を汚染している病原体を不活性化するための装置および方法を意図している。本発明の装置の一態様の主な特徴には、A) サンプル容器を支持する手段から固定された距離にある安価な紫外線源、B) 迅速な光活性化、C)

大きなサンプル処理量、D) 照射サンプルの温度制御、E) 固有の安全性、及び F) サンプル容器が含まれる。

A. 電磁放射線源

本発明の好ましい光活性化装置は、サンプル容器を支持するための手段から固定された距離にある安価な紫外線源を有する。紫外線は、電磁放射線スペクトルの一部を占めるエネルギーの一形態である（電磁放射線スペクトルは宇宙線から電波にまで及ぶ）。紫外線は、多くの天然線源及び人工線源から得られる。紫外線の線源に依っては、それに他の（非紫外の）タイプの電磁放射線（例えば、可視光）が伴うことがある。

本明細書では、特定のタイプの紫外線を波長によって記載する。本明細書では波長をナノメートル（nm； 10^{-9} メートル）で表す。本発明の目的のためには、紫外線は約180 nm～400 nmに及ぶ。放射線源がフィルター又は他の手段によって特定の波長（例えば、320 nm）より短い波長の放射線を通さないときは、それはその波長で下端“カットオフ”（例えば、320 ナノメートルの短波長カットオフ）を有すると言われる。同様に、放射線源が特定の波長（例えば、360 nm）より短い波長の放射線しか通さないときは、それはその波長で上端“カットオフ”（例えば、360 ナノメートルの長波長カットオフ）を有すると言われる。

どのような光化学反応についても、あらゆる有害な副反応を排除するか又は少なくとも最小限にすることが望まれる。これら副反応のあるものは、光活性化操作の間に存在し得る内因性発色団の励起により起こり得る。核酸とブソラレンシが存在しない系においては、この内因性発色団は核酸塩基自体である。光活性化方法を320 nmより大きな波長に制限すると、313 nmより長い波長では核酸による吸収が殆どなくなるので、核酸の直接的損傷が最小限に抑えられる。

血液製剤中で核酸は典型的には他の生体発色団と一緒に存在している。生物学的液体がタンパク質だけであるなら、副反応を最小限にするのに320 nm短波

長カットオフで十分であろう（芳香族アミノ酸は320 nmをより短い波長では吸収しない）。生物学的液体が細胞および／または細胞性成分を含むなら、ヘム

やフラビンを含む多くの他の発色団が存在するだろう。

ヘムは、血液製剤中に豊富に存在し、赤血球の溶解により生じる。フラビンは、ヘムと同様に、代謝呼吸に必要とされる。これら内因性発色団は両方とも光照射によって励起されると細胞に損傷を与えるだろう。

ヘムは3本の主要な吸収バンドを有する。2本は可視スペクトルの赤色領域にあり、もう1本は約400 nmを中心としている。フラビンは、2本の主要な吸収ピークを有する。1本は450 nmにあり、もう1本は370 nmにある。

これら内因性発色団が血液製剤中に存在することから見て、本発明の装置の1つの態様においては、狭い範囲内の特有かつ望ましい波長での照射を可能にし、かくしてエネルギー伝達によって起こる細胞への損傷を避けるように、本装置を設計しようとするものである。望ましい波長の好ましい範囲は320~350 nmである。

市販の照射源を選ぶことによってかなりの選択性を達成できる。例えば、典型的な蛍光管は300 nmから400 nmを上回る波長まで(360 nm辺りを中心とする幅広いピークを有する)を発するが、BLB型蛍光ランプは400 nmより長い波長を除くように設計されている。しかしながら、これは長波長カットオフを備えるだけである。

好ましい態様においては、本発明の装置は追加のフィルター手段を含む。1つの態様においては、このフィルター手段は、一枚のコバルトガラスの如きガラスカットオフフィルターを含む。他の態様においては、このフィルター手段は、電磁スペクトルの特定範囲だけを透過する $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ の水溶液の如き液体フィルター溶液を含む。この塩溶液は320~400 nmの透過窓をもたらす。好ましい態様においては、この $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ の水溶液を NiSO_4 と組み合わせて用いて、用いる蛍光源又はアーク発生源の発光スペクトルの365 nm成分を除去する。この $\text{Co}-\text{Ni}$ 溶液は、高エネルギー線源の直接光に何十時間も露光した後でさえも極めて良好にその初期透過性を保存する。

本発明は用いる特定のフィルターにより限定されるものではない。幾つかの無

機塩及びガラスが必要な要件を満足する。例えば、硫酸第二銅は、紫外だけを取

り出そうとする場合に赤外を除去するのに最も有用な一般的フィルターである。それは強力な線源中で安定である。当業者には他の塩が知られている。アパーチュア又はレフレクターランプも特定の波長及び強度を達成するのに用いることができる。

本明細書において紫外線を放射照度によって記載する場合、それは強度フラックス（平方センチメートル当たりのミリワット数又は“ mW cm^{-2} ”）により表示される。“出力”は本明細書では紫外線の放射（あり又はなし；オン又はオフ）並びに放射照度のレベルの両方を包含するものと定義される。好ましい態様においては、強度は少なくとも4箇所、つまり照射平面のそれぞれの側について少なくとも2箇所モニターされる。1つの態様においては、これらモニターはそれぞれが1又は2以上の紫外線源の出力を測定するために据え付けられた光ダイオードである。

好ましい紫外線源は蛍光源である。蛍光は発光の特殊なケースである。発光は、物質による電磁放射線の吸収及び異なる波長の放射線へのエネルギーの変換を伴う。蛍光では、その電磁放射線により励起された物質は、特定量の電磁放射線を放射することによりその基底状態に戻る。これまで、蛍光源は光活性化に役立てるにはあまりに強度が低過ぎると考えられてきたが、1つの態様においては、本発明は蛍光源を用いて、今まで高価な設備でしか達成できなかった結果を得るものである。

本明細書で用いる場合、“固定された距離”とは、複数の血液バッグを支持するための手段が規定する平面内のある点と光源内のある点の間の一定の距離として定義される。点光源からの光強度はその点光源からの距離の二乗に反比例することが知られている。従って、光源からの距離の小さな変化が強度に激的な影響を有し得る。強度の変化は光活性化結果に影響を与え得るので、本発明は、長い棒状のランプを放射線源に用いることを意図している。長い棒状のランプは、放射線の強度への小さな距離の変化の影響を最小限にするので、再現性及び反復性が得られる。

幾何学的配置は光源の位置決定に関係している。例えば、光源をサンプルホル

ダーの周囲にいろいろなやり方で（その両側面に、底部に、輪状等にして）配置することが想像できよう。本発明の好ましい態様で用いられる幾何学的配置は、迅速な光活性化のために適切な強度での1を越えるサンプルの均一な露光を可能にする。本発明の好ましい装置の幾何学的配置は、1個の点光源とは対照的に線状ランプの複数光源を包含する。加えて、幾つかの反射面と幾つかの吸収面がある。反射面は、複数のサンプルそれぞれへの露光を一様にするための助けとなり得る。この複雑な幾何学的配置の故に、照射すべきサンプルの位置に対するランプの位置又は数の変化が避けられることになるのである。なお、かかる変化は強度変化をもたらす複数サンプルへの露光の強度にバラツキをもたらすであろう。

均一な露光を得るに際して他に考慮することは、照射の間のサンプル容器の付属物への備えである。本発明は、チューブ、バルブ、血液製剤貯蔵バッグ、及び血液製剤を含有するバッグに普通に取り付けられている他のあらゆる装備の如き付属物を考えている。これは、それら付属物による光の遮断を回避するためである。1つの態様においては、血液バッグ支持手段がそれら血液バッグに繋がれている複数の付属物を特定の位置に納める手段を有するので、それら付属物がそれら血液バッグに対する放射線の強度を有意に弱めることはない。

一度に数サンプルが照射されようと1サンプルだけが照射されようと、照射装置が同じ強度の放射線をサンプルに照射することは有用である。本発明は、光源と照射されるサンプルの間に据えることができる放物線状レフレクターグリッドを使用することを意図している。これらグリッドは、1を越えるサンプルを同時に照射するときに、光の散乱を少なくしてサンプルを照射する光の減少を回避するように光を通過させるものである。

他の態様においては、本発明は、照射中にサンプルを混合するために、震盪機又は攪拌機の如き震盪手段を使用することを意図している。この混合は、バッグの異なる部分のサンプル物質が受ける放射線に平均化作用を有し得る。震盪が照射予測可能性に作用する如何なるメカニズムによっても制限されるつもりはないが、震盪によってサンプル物質が照射の間そのバッグ全体をくまなく移動することによって、そのサンプルの各部分が多くの異なる位置で露光されて照射を受けると考えられる。バッグの異なる部分で様々な強度の放射線が存在する場合には

移動はそのサンプル内での強度の変化を少なくするように働くであろう。

本発明は、更に、光源からの光の送達量はその光源の長さに沿って凡そ均一であろうことを意図している。幾つかの光源、特に長い管状電球は、その電球の両端部で出力が減衰する。これら端部は、最も多くの熱を発する傾向もある。一様な発光を確保しかつ温度を確実に制御するために、本発明の1つの態様では、光源の約2～6cmのそれぞれの端部が装置中でサンプルを照射しないように、光源の両端部のまわりを包むリップを有する。

B. 迅速な光活性化

本発明の好ましい態様の光源は、迅速な光活性化を可能にする。この照射装置の強度特性は、多数のサンプルセットを処理する必要があり得ると予想して、それに便利ないように選択されている。この予想では、15分又はそれ未満の露光時間が実質的な目標となる。紫外線源のフラックスは一定時間内に変動するので、本発明の好ましい態様においては、数個の光出力検出器を装置全体に取り付けて光源の出力を測定する。1つの態様においては、これら検出器は、一定の出力レベルに到達したときに光源を遮るように調節することができるフィードバック制御に接続される。これは反復性を確保するものであり、血液製剤中の病原体を不活性化するとき好ましい。血液製剤が受ける光を制御することで、損傷を与えるかも知れない過剰な光にサンプルを曝すことなく、病原体を不活性化するのに十分な露光を確保することもできる。

本発明の装置を設計する際して、好ましい装置の部材の相対位置を15分の照射時間を可能にするように最適化した結果、320～350ナノメートルの波長について測定したときに、約 1 mW cm^{-2} より大きな、好ましくは 15 mW cm^{-2} の強度フラックスがサンプル容器にそそがれる。好ましい態様においては、この装置はバッグの両面を照射する。

C. 多数のサンプルの処理

前述のように、本発明の光活性化装置の他の重要な特徴は、それらが多数のサンプルを処理できることである。これに関して、本発明の装置の1つの部材は、

複数の血液製剤、特に血液バッグを支持する手段である。本発明の好ましい態様においては、この支持手段は、一度に50mlバッグ6つ分 (Dupont Sterical

(商標)バッグに相当する) の容量を有する2列の光源の間のガラスプレートに加えて、コネクターとチューブを含む。広く用いられている市販の血液バッグを受け入れることにより、本発明の装置で、多数のサンプルを簡便に処理することができる。

好ましい態様においては、このプレートは、前記血液バッグに付いているチューブ及び付属貯蔵バッグの如き付属物を特定の位置に納める手段を有するので、それら付属物がそれら血液バッグに対する放射線の強度を有意に弱めることはない。

D. 温度調節

注目されるように、本発明の光活性化装置の重要な特徴の一つは温度調節である。露光の時点におけるサンプルの温度は結果に著しく影響し得るので、温度調節は重要である。例えば、核酸において二次構造を促進する条件はまた核酸に対する多くのプソラレン誘導体のアフィニティー定数も高める。HydeおよびHearst, *Biochemistry*, 17, 1251 (1978)。これらの条件は溶媒組成および温度の両方の組み合わせである。一本鎖5SリボソームRNAでは、低温における照射は20℃に較べて4℃で5S rRNAへのHMTの共有付加を2倍増進する。Thompsonら, *J. Mol. Biol.* 147:417(1981)。温度によって誘発されるプソラレン結合の更なる増進は合成ポリヌクレオチドで報告されている。Thompsonら, *Biochemistry* 21:1363 (1982)。

バクテリアに関して、架橋の修復が照射中に起こることは注目されるべきである。しかしながら、照射が低温で行われる場合、バクテリア修復プロセスが抑制される。たとえば、15℃の照射は観察される不活化のレベルに関して有意な効果を有する。

更に、或る種の血液製剤は温度の小さな変化により損傷をうけることがある。例えば、血小板は、22℃±2で保たれる場合に最良に保存される。従って、血小

板用の光活性化装置は照射中に血小板をこの範囲内またはその付近に維持することが好ましく、さもないと血小板の臨床上的効力が低下する可能性がある。

その装置における照射中の血液製剤の温度を調節するいずれかの特別な手段に限定することを意図しないで、一つの実施態様においてその装置には二つの温度調節手段が使用される。第一の温度調節手段は空気をその装置のハウジングの外部から吹き込んで、放射線提供手段を横切って吹き出すことによりそれらを冷却し、そして照射されるサンプルへの伝熱を避けるための手段である。

第二温度調節手段は密閉系中で作用し、第一温度調節手段から排出された空気中に運ばれる熱の循環を避けるために、その系内からの空気のみを冷却、循環させる。第二手段は冷却空気を空気循環室中そして血液バッグがあるチャンネル内に循環させるためのものである。この第二温度調節手段には熱交換器および冷却空気を循環するための手段が使用される。熱交換器は、温度調節液の循環のため

の入口および出口を有する導管であることが好ましい。その導管は高い熱伝導度を有する波形材料で覆われていてもよく、この材料は導管と空気との間の熱の交換のための表面積を増大するのに利用できる。一つの実施態様において、空気を循環するための手段はDCモーターにより駆動され、これはACモーターよりも周囲に生じる熱が少ない。また、空気を循環するための手段をハウジングの外部から駆動してもよい。いずれもハウジング内に生じた熱の量を調節する。

冷却空気は導管中を通り、血液製剤を含む血液バッグを横切って、そして血液バッグを包囲する室およびチャンネルを通して循環する。また、室およびチャンネルは、装置のハウジングの外部に由来する空気または電磁放射線提供手段を通過する空気との有意な交換から遮断され、それにより空気を再循環させる“密閉系”を生じる。別の実施態様において、本発明は、第二温度調節手段が光活性化装置のハウジング内に設置された冷却ユニットを含むことを意図している。

第二温度調節手段中を循環する空気は第一温度調節手段を通して吹き込む空気と混ざらない。このような温度調節の分離によってサンプルは適度に冷却される。

一つの実施態様において、本発明の装置は、サンプルに可変の周波数および振

幅の水平の一方向かつ正弦の運動を与える、シェーカーまたはアジテーターの如き揺動手段を含む。照射中、その装置による揺動手段の使用は、照射中に血液バッグ中のサンプルを混合することにより血液バッグ内のサンプル中の均一な温度を維持することを意図するものである。更に、血小板サンプル用のシェーカーを使用することにより貯蔵中の血小板活性化を減少する。一つに実施態様において、シェーカーは照射装置のハウジング内に配置され、血液バッグ支持手段と直接接触することによりサンプルを移動する。下部プレートアセンブリーの頂部プレートは下部プレートアセンブリーの残りに対して固定されなくてもよいことが意図されており、こうしてシェーカーを頂部プレートと直接接触させて攪拌させる。また、シェーカーによる下部プレートアセンブリー全体の移動も意図されている。また、シェーカーはハウジングの外に配置されてもよく、その装置のハウジング全体を移動させることによりサンプルを移動させる。本発明は、揺動中にサンプル血液バッグの位置を維持するのに十分な摩擦を与えるうねった上表面を有する血液バッグ支持手段の使用を意図している。

別の実施態様において、ランプ、安定器およびその他の熱源からの熱は、種々の熱源とバッグとの間の一つまたは幾つかの間仕切により、血液バッグから隔離される。これはサンプル中の生物学上許される温度を維持することを更に助ける。

E. 固有の安全性

紫外線は重度のやけどを生じることがある。照射の性質によって、それはまた癌を生じさせ得る。本発明の好ましい実施態様の光源は使用者に対して遮蔽する。これは市販の手で保持される紫外線源並びに大きな高強度の線源とは対照的である。好ましい実施態様において、照射源は放射エネルギー透過を妨げる材料でつくられたハウジング（即ち、不透明のハウジング）内に入れられる。放射線が使用者には照射されない。これは使用者にとって固有の安全性を保障する。

F. サンプル容器

照射装置中で照射されるサンプルを保持する容器の材料は、照射装置が如何に良好に作動するか否かに影響し得る。使用される材料は放射線のサンプル透過お

よび容器にあたっている放射線の散乱量に影響し得る。本発明の一つの実施態様のサンプル容器は、紫外線に対して透過性のあるプラスチック、好ましくはテフロン（アメリカン フルロシール (MD、シルバー スプリング) から入手し得る）製の血液バッグである。その他幾つかの許容されるプラスチック成分はエチル酢酸ビニル（テルモ（日本）から入手し得るバッグ）、ポリ（塩化ビニル）(PVC)（バクスター トラベノールまたはカッター (CA、コビナ) から入手し得るバッグ）であり、これらは可塑剤と混合されていてもよく、またはポリオレフィン（バクスター トラベノール ラボラトリイズ社のフェンワル ディビジョン（イリノイ、デアーフィールド）から入手し得るバッグ）である。PVCのために考えられる可塑剤はジ(2-エチルヘキシル)フタレート (DEHP)、トリ（2-エチルヘキシル）トリメリテート (TBM) である。しかしながら、本発明は血液バッグの組成がいずれかに限定されることを考えてはおらず、紫外線に対して多少透過性のあるいずれかのバッグの使用を考えている。また、その材料は照射されるサンプル中の成分濃度に影響し得る。好ましい実施態様において、サンプルはサン

プル中に含まれる光反応性化合物が有意な%で結合しないバッグに入った状態で照射装置において照射される。

また、容器のパラメーターは、サンプルが照射中に受ける影響を若干調節する。例えば、血小板貯蔵用の血液バッグは、その壁が十分に薄くて十分に酸素が供給でき、血小板の生存を減少させる乳酸産生速度の増加を抑えられれば、血小板をより良好に保存する。Carmen, R., “血液バッグ用のプラスチック材料の選択”, *Transfusion Med.Rev.* 7:1(1993)。

血液製剤の性質は効率に影響し得る。赤血球は、例えば、血小板が吸収するのとは異なる波長の光を吸収する。赤血球は光を遮断するために照射の効率を低下させ得る。それ故、赤血球が混入している血小板は、赤血球を含まない血小板製剤よりも低い光の強度を示すかもしれない。

先に指摘したように、強度の変化は光活性化の結果に影響を与え、これらの変化は放射線が通過しなければならないサンプル内の距離に変化をもたらし得る。血液バッグの壁、および血液製剤の容積により定義されるサンプルの厚みはまた

、サンプルに到達し得る光量に影響する。本発明の好ましい実施態様において、照射用のサンプルを含む血液バッグが照射装置内に置かれている時に、それは約0.1~4 cmの“中央路長”を有する血液製剤のフィルムを形成する。“中央路長”は、ここで、バッグの中央を通る血液バッグの二つの壁間の最短距離と定義される。一つの実施態様においては、サンプルの“中央路長”は使用される全てのバッグに関して固定された値である。これによって再現性と反復性が与えられる。好ましい実施態様において、サンプル物質を移動させ、またはスラッシングさせるためにシェーカーを使用すると、その結果、サンプルのそれぞれの部分が照射中に血液バッグの表面に運ばれる。これにより再現性および反復性を保ちながらバッグの中央路長を変化させる。何となれば、攪拌によりサンプルが血液バッグの表面を循環できるからである。それにより、十分な光が中央路長と無関係にサンプルに到達できることが保障される。別の好ましい実施態様において、好ましい“中央路長”を得るために、重力以外の他の圧力を照射装置によって、またはその他の圧力源によりバッグに加える必要はない。一つの実施態様においては、上部および下部のプレートアセンブリーを約1~10cmの間隔で離し、その範囲内

の中央路長を有するバッグを収容する。

実験

下記の実施例は本発明の或る好ましい実施態様および側面を説明するのに役立つ。本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。

下記の実験の開示において、下記の略号が適用される。eq (当量) ; M (モル) ; μ M (マイクロモル) ; N (規定) ; モル (モル数) ; mモル (ミリモル数) ; μ モル (マイクロモル数) ; nモル (ナノモル数) ; g (グラム) ; mg (ミリグラム) ; μ g (マイクログラム) ; L (リットル) ; ml (ミリリットル) ; μ l (マイクロリットル) ; cm (センチメートル) ; mm (ミリメートル) ; μ m (マイクロメートル) ; nm (ナノメートル) ; $^{\circ}$ C (摂氏温度) ; HPLC (高速液体クロマトグラフィー)

実施例 1

上記のように、本発明は光反応性の核酸結合性化合物の活性化のための装置お

よび方法を意図している。この実施例では、本発明の方法により血液製剤を汚染除去するための光活性化装置が記載される。この装置は、a) 適当な波長の電磁放射線を与えて少なくとも一種の光反応性化合物の活性化を生じさせるための装置；b) 活性化中に放射線供給装置から一定の距離に多数の血液製剤を支持するための装置；およびc) 血液製剤の温度を活性化中に所望の温度範囲内に保つための装置を含む。図1は、上記の特徴を統合した装置の一実施態様の斜視図である。この図は、プレートアセンブリ103、104の間に配置された複数の代表的な血液製剤を含む手段102の上下にバルブ101のアレイを含む不透明のハウジング100(その一部が除去されている)を示す。プレートアセンブリ103、104は続いて更に十分に説明される。

バルブ101(これらは電源(図示されていない)に接続可能である)は、電磁放射線の源として利用できる。特別なバルブの型に限定されないが、その実施態様は工業規格の二重ビピン(dual bipin)ランプを受け入れるような形状にされている。

ハウジング100は、血液製剤を適切に入れることができるようにラッチ105により開放し得る。図1に示されるように、ハウジング100は、閉じられた場合に、バルブ101からの放射線を完全に含む。照射中に、使用者は、安全ビューポート106(これは使用者への紫外線の透過を許さない)を通してながめることによりその装置が作動していることを確かめることができる。

また、ハウジング100は、例えば、主電源スイッチ、カウントダウンタイマー、および時間メーターを含む制御板107の幾つかの電子部品の取付装置として利用できる。便宜上、電源スイッチはカウントダウンタイマーに配線でき、これは順に時間メーターおよび電磁放射線の源に並列に配線される。カウントダウンタイマーは、使用者が照射時間を所望の露光のレベルにすることを可能にする。時間メーターは、電磁放射線の源により与えられる照射時間の合計数の記録を維持する。この特徴は、バルブの出力が迅速な光活性化に必要な最小レベルより下に減少する前に、バルブ101を監視して、それを変化させる。

図2は2-2の線に沿った図1に示された装置の断面図である。図2は、ハウジ

ング100が開放された場合のバルブ101の配置を示す。反射手段108A、108Bがバルブ101のそれぞれのアレイを完全に包囲する。血液製剤を含む手段102が上部紫外線透過プレートアセンブリ103と下部紫外線透過プレートアセンブリ104の間に置かれる。上部プレートアセンブリ103が下部プレートアセンブリ104より下に下げられる場合、上部プレートアセンブリ103および下部プレートアセンブリ104はチャンネル(116-この図に示されていない)を形成し、その中で空気が循環されて血液製剤を含む手段を冷却し得る。それぞれのプレートアセンブリは頂部プレート103A、104Aおよび底部プレート103B、104Bを含む。プレートアセンブリ103、104は、血液製剤を含む手段102により生じた空間を収容するように設計されるヒンジ109を介して連結される。上部プレートアセンブリ103は、下部プレートアセンブリ104の底部プレート104Bにより支持された血液製剤を含む手段102の上に静かに載るようにされる。別の実施態様において、上部プレートアセンブリ103はハウジング100と固定された関係であってもよく、上部プレートアセンブリ103を含むハウジングの上部全体が血液製剤を含む手段102の上部より丁度上に載るようにされる。

検出器110A、110B、110C、110Dは、プレートアセンブリ103、104のプレート103A、103B、104A、104Bの間に都合良く置くことができる。それらは印刷回路板111に配線でき、これは順に制御板107に配線される。

図3は3—3の線に沿った図1に示された装置の断面図である。6個の血液製剤を含む手段102(例えば、テフロン血小板ユニットバッグ)が、バルブ101のアレイの上に固定関係で置かれる。血液製剤の温度が、ファン112単独により、または、更に好ましくは、冷却源(図示されていない)に連結された冷却入口114および冷却出口115を有する熱交換器113を使用することにより調節し得る。

図4は4—4の線に沿った図1に示された装置の断面図である。図4は、その装置の好ましい実施態様の温度調節方法を更に明らかに示す。上部プレートアセンブリ103が下部プレートアセンブリ104より下に下げられる場合、上部プレートアセンブリ103および下部プレートアセンブリ104は上部アセンブリ103の底部プレート103Bおよび下部アセンブリ104の頂部プレート104Aにより境界

を画されたチャンネル116を形成する。上部プレートアセンブリープレート103A、103Bおよび下部プレートアセンブリープレート104A、104Bのそれぞれが、空気循環室103C、104Cをそれぞれ形成する。ファン112が室103C、104C内に空気を循環し得る。熱交換器113が使用される場合、循環空気がファン112により冷却され、空気循環室103C、104C内のプレート103A、103B、104A、104Bの間に通され、次に上部プレートアセンブリー103と下部プレートアセンブリー104の間のチャンネル116を通して熱交換器113に戻され、それにより血液製剤を含む手段を冷却する。循環空気は、ハウジング100がチャンネル116、空気循環室103C、104C並びに熱交換器113およびファン112の表面を含んで、閉じられた位置にある時に密閉系内に保たれる。密閉系内の空気はハウジングの外部または密閉系の一部ではないハウジング内部、例えば、バルブ101を包囲する領域で空気と混ざらず、また交換しない。

実施例 2

図5は、血小板が本発明の方法により処理される実施態様を示す。分別後に、血小板が、核酸結合性化合物を含むバッグ（陰をつけたバッグとして図1に示される）に移される。次に、このバッグ（これは本発明に適した透過性およびその

他の特性を有する）が照射装置（例えば、上記の実施例1に記載された装置）中に入れられ、そして照射される。遊離化合物が回収されてもよく、または所望により捕捉装置により“捕捉されてもよい”。このような場合、バッグは細胞中に含まれる化合物のみを含むであろう。すなわち、そのバッグは遊離の化合物を含まないであろう（このバッグは陰をつけていないものとして図1に示される）。

実施例 3

この実施例において、本発明の汚染除去方法がエルジニア・エンテロコリチカ (*Yersinia enterocolitica*)、野生型、血清型3、生物型4を失活するのに適用される。この生物は血液製剤中に見られる。一般には、R.Y.Dodd, Transfusion Medicine in the 1990's (American Assoc. Blood Banks 1990) (S.J.Nance, 編集) を参照のこと。また、B.J.Grossmanら, Transfusion 31:500 (1991) を参照のこと。

その生物の一夜培養物を、運動性穿刺(motility stab)からのブレインハートインフュージョン(BHI)プロス10mlに接種することにより行った。これを35℃に保ち、その0.1 mlを使用して実験用のBHIプロス20mlを接種した。35℃で一夜インキュベートした後、静置培養物を1900gで15分間にわたってペレット化し、上澄みを捨て、そしてバクテリアペレットを熱不活化した普通の血清プール1 ml中に懸濁させた。これをアラメダーコントラ・コスタ・メディカル・アソシエーション(Alameda-Contra Costa Medical Association)の血液バンクから得られたヒト血小板の期限が切れたばかりのユニットに注入した。バクテリアを含む血小板濃厚液のアリコート5 mlをバッグから取り出し、対照(これはブソラレンを使用せずに照射されたか、または処理を受けていなかった)以外は、特定量の8-MOPおよびUVA照射を受け取った(表2を参照のこと)。血小板濃厚液を循環水浴に取り付けた栓付きガラス製水ジャケット室に入れることにより温度を照射中に25℃に保った。照射装置(デルマ・コントロール(Derma Control)、ドルトン(Dolton)、111.; 型番号1224-スペシャル)は二つのアレイ(2.5インチで隔置された6個のランプ/アレイ)を使用し、一つのアレイは試料の上であり、そしてもう一つのアレイは試料の下にあった(こうして、試料はランプから約3インチ

のところにある)。各アレイは約6インチだけ他のものから分離されており、その背後に研磨された金属リフレクタを有し、そしてUVA透過性アクリルプラスチックシートで覆われている。処理すべき試料(例えば、血小板バッグ)は下部シートの上に置かれる。

表 2

	薬剤	8-MOP/ml	照射時間 (分)	log/ml	力価
1	薬剤なし		0	9.1	
2	薬剤なし		10	9.3	0.2
3	8-MOP	30 μ g	10	<0	>-9.1
4	8-MOP	10	10	<0	>-9.1
5	8-MOP	3	10	3.4	-5.7
6	8-MOP	0.2	10	6.8	-2.3
7	8-MOP	0.06	10	9.0	-0.1

デルマ・コントロールF587T12-BL-HO型バルブを使用した。これらは長さ24インチの“ブラックライド”チューブ（内部蛍光被覆物により特定の波長を放出するように工作されている）である。最大波長は、簡単な水銀ランプまたは普通の“BLB”蛍光バルブと異なり、360nm未満である。全強度は20mW/cm²未満である。

BHIブロス中の連続10倍希釈液0.1mlを、BHI寒天を含む100mmのペトリ皿にプレートすることによりバクテリアを定量化した。35℃で24時間のインキュベーション後に、コロニーをカウントし、バクテリア濃度を1ml当たりの基準で計算した。結果（表2）は3 μ g/ml程度に少量の8-MOPが6 logのバクテリアを殆ど失活することができることを示す。10 μ g/mlでは、10分が充分すぎる照射を与える。実際に、10 μ g/mlでは、5分間の照射が適当であることが明らかである。

実施例 4

アルタック (Artuc) とその共同研究者らがヒトおよびウシの血清タンパク質中の8-MOPの溶解性を試験し、100~1000ng/mlの範囲の8-MOP濃度、即ち、乾癬

のプソラレン紫外線A (PUVA) 治療を受けている患者で観察された濃度と同様の濃度では、8-MOPの75%~80%がアルブミンに結合されることを示した。M. Artucら, Brit. J. Derm. 101:669(1979)。

この実施例では、本発明の汚染除去方法のもとにプソラレン-核酸相互作用の有効性を実証するために、血漿およびタンパク質不含媒質を使用して、ウシ胸腺DNAへの8-MOPの結合が比較される。この測定はバクテリア核酸ではなく真核生物

核酸を使用した。それはバクテリアに関する付加物生成の程度の有益な指標となる。

^3H -8-MOPを 4.7×10^6 CPM/マイクログラムの比活性でエタノール中 $115 \mu\text{g/ml}$ の濃度に調製した(以下、“8-MOP原液”)。その後、DNAを含む試料(“+DNA”)につき8-MOP原液 $130.5 \mu\text{l}$ または $22 \mu\text{l}$ (それぞれ2つ)、またDNAを含まない試料(“-DNA”)につき $52.2 \mu\text{l}$ または $8.7 \mu\text{l}$ を乾燥させた。+DNA試料に、DNA原液(7.7mg/ml) $40 \mu\text{l}$ を添加しただけでなく、血漿(1日経過の凍結したもの) $460 \mu\text{l}$ またはトリス-EDTA(“TE”)緩衝液 $450 \mu\text{l}$ を添加した。後者には5MのNaCl $10 \mu\text{l}$ も添加した。-DNA試料(即ち、対照)につき、血漿 $184 \mu\text{l}$ および水 $16 \mu\text{l}$ を添加した。

試料を約1時間にわたって軽くボルテックス混合し、カウントをチェックして8-MOPが溶解したことを確かめた。

それぞれの試料($100 \mu\text{l}$)を 25°C で0分、2分、4分、8分、および16分にわたってHRI-100(HRIリサーチ社、コンコード、CA)で照射した。試料を照射後 4°C に一夜保った。その後、試料を抽出した。最初に、フェノール溶液を0.1Mのトリス pH8で平衡にすることによりpH8に調整した。次にそれぞれの試料をフェノール $100 \mu\text{l}$ で抽出した。それぞれの試料を5分間遠心分離して水相を新しいチューブに移した。2回目の抽出を $100 \mu\text{l}$ のフェノール:クロロホルム(1:1)で行った。最後の抽出を $100 \mu\text{l}$ のクロロホルムで行った。

最後の水相を、0.2MのNaClの最終濃度を得るように調節されたNaCl $50 \mu\text{l}$ を添加し、次にエタノール $250 \mu\text{l}$ を添加することにより沈殿させた。再度、試料を遠心分離した(10分間)。上澄みを除去し、ペレットを乾燥させた。ペレットをTE $100 \mu\text{l}$ に再度懸濁させ、そして再度沈殿させた。これを合計3回の沈殿に

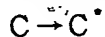
つき繰り返した。最後のペレットを水 $600 \mu\text{l}$ に入れ、 $100 \mu\text{l}$ をカウントした。それぞれの試料を、吸光度(260nm)を測定することによりDNAにつき分析した。8-MOPレベルを1000の塩基当たりの付加物としてプロットした(“8-MOP:kBP”)。

結果(図6)は、血漿がDNAへの8-MOPの付加速度論を殆ど変化させないことを示す。核酸への添加が、タンパク質不含媒質中で極めて良好である。

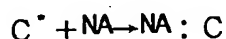
タンパク質不含媒質中の8-MOP-DNA付加物生成の頻度はバクテリアゲノムの高度の修飾を予告する。更に、この型の生化学的測定は、光化学失活方法の効率を監視する手段を与える可能性を有する。

実施例 5

プソラレンおよびイソプソラレンの光活性化は種々の光生成物を生じ得る。“光生成物”は、電磁放射線の活性化波長に暴露された場合の光反応性化合物の可能な反応を考えることにより最も良く理解される。正確な機構に限定されないが、基底状態(“C”)の光反応性化合物と活性化波長の電磁放射線の反応は短命励起種(“C^{*}”)を生じると考えられる。

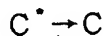


次に起こることは、主として、潜在的な反応体が励起種に対し利用可能である作用である。それは短命であるので、この種と核酸(“NA”)の反応は、励起種が生成される時に核酸が存在する場合にのみ可能であると考えられる。こうして、その反応は、操作に関して、活性化波長の電磁放射線の存在下にある必要があり、即ち、それは“光結合性”である。それは暗結合性ではない。その反応は以下のように表し得る。



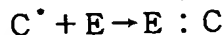
この反応の生成物は、以下、“光付加生成物”と称され、“光生成物”とは区別されるべきである。

記載されるこの反応により、その化合物が活性化波長の電磁放射線に暴露される時に核酸が結合に利用されない状況を今考えることができる。励起種は短命であり、反応する核酸を有しないので、励起種は単にその基底状態に戻る可能性がある。

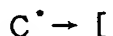


一方、励起種はそれ自体(即ち、基底状態または励起種)と反応して基底状態複合体(“C:C”)を生じ得る。2種の化合物が反応するこれらの自己反応の生成物は“光二量体”または単に“二量体”と称される。しかしながら、自己反応は2種の化合物に限定されない。種々の多量体(三量体、等)が生成し得る。

励起種はそれ自体と反応することに限定されない。それはその環境、例えば、溶媒の要素(“E”)(例えば、イオン、ガス、等)と反応してその他の生成物を生成し得る。



この種の反応(例えば、一重項酸素種を生じる酸素との反応)は細胞の損傷を生じると考えられる。更に、それは単に基底状態誘導体(“[”)に内部転位(“異性化”)し得る。



最後に、励起種は、ここに記載された以外のその他の反応を受け得る。

本発明および“光生成物”の理解は、これらの反応の一つ(たとえあったとしても)が実際に起こることに依存しない。“光生成物”は、その性質がどのようなものであろうとも、化合物と活性化波長の電磁放射線の反応後に、反応環境のその他の成分と相互作用し得る生成された生成物が結果的に得られる場合に存在すると考えられる。

4'-ヒドロキシメチル-4,5',8-トリメチルプソラレン(HMT)の如きプソラレンでは、HMTが活性化波長の電磁放射線に暴露される場合に生成された幾つかの生成物が得られる。HMTの得られる主生成物は2種のシクロブチル光二量体である。二量体の一つにおいて、二つのピロン環がシス-シン配置で結合され、一方、その他の二量体において、結合が再度シス-シン配置で一つの分子のフラン末端と他のピロン末端の間に生じる。HMTの第三の得られる生成物は単量体HMT光異性体である。この異性体において、中央の環酸素は通常の1, 3配向に代えて1, 4配向をとる。2種の光二量体は幾何学的形状を考慮して介在活性を有するとは予測されないであろうが、光異性体は平面のままであり、従って、それは二本鎖核酸とポジティブな介在的会合を有し、こうして、突然変異誘発物質であり得る

ことが意図されている。

この実施例において、8-MOPの光化学的分解がAMTと比較される。試料を、ライネン・ダイナマックス(Rainen Dynamax)300Aカラムを使用して逆相HPLCにより分析した。勾配溶離を0.1Mの酢酸アンモニウム/アセトニトリル(42分間で0~70

%のアセトニトリル)を用いて行った。AMTは、これらの条件下で約24分で単一ピークとして溶離する。検出は260nmまたは330nmにおける吸収によるものであった。後者の波長を、血漿を含む試料につき使用した。

それぞれの化合物の標準溶液を種々の濃度で調製した。次にこれらの溶液を水で1:10に希釈し、次に300 μ lを分析のために注入した。全ての試料を300nmで監視した。ピークを、ピーク高さまたはピーク面積を測定することにより分析し、次に標準プロットを使用してgh/mlに換算した。ピーク面積は、そのトレースを複写し、ピークのコピーを切断し、次に得られるトレースを計量することにより測定した。二つの方法は実質的に同じ結果を与えた。

結果を図7に示す。明らかに、AMTは8-MOPよりも迅速に分解する。それ故、それは更に多くの光生成物（これらは最終的に輸血レシピエント中に入るだろう）を生成すると予測されるであろう。対照的に、8-MOPは有意な量の光生成物を生成するとは予測されない。これは、権威者が活性化されていない8-MOPが非突然変異誘発性であると結論したことを考える場合に重要である。

実施例 6

血小板が活性化されたようになる時、GMP140と称される α 顆粒膜糖タンパク質が血小板表面に露出されるようになる。新しい正常な刺激されていない血小板の5%未満がフローサイトメトリーにより検出可能なGMP140レベルを発現する。一般的にはM.J.Metzelaar, Studies on the Expression of Activation-Markers on Human Platelets(Thesis 1991)を参照のこと。

GMP140を測定するために、血小板に富む血漿の少量アリコートがGMP140結合性抗体または対照マウスIgGを含むHEPES緩衝液に入れられる。CD62は、GMP140に結合する市販のモノクローナル抗体（オランダ、ウデンにあるサンビオ(Sanbio)；カリフォルニア州、サンフランシスコにあるカルタグ・ラブズ(Caltag Labs)お

よびカリフォルニア州、マウンテン・ビューにあるベクトン・ディキンソン(Becton Dickinson) から入手できる) である。15分のインキュベーション後に、FITCに結合されたヤギ抗マウスIgGを飽和量でチューブに添加する。最後に、細胞を等張食塩水中で希釈し、パラホルムアルデヒドで定着し、FACSCAN（カリフォ

ルニア州、マウンテン・ビューにあるベクトン・ディキンソン)で分析する。陽性対照を、フォルボールミリスレートアセテート(PMA)を試験系に 10^{-7} Mの最終濃度で添加することによりつくる。

この実施例において、CD62を使用して血小板活性化に関する照射単独の影響(存在する場合)を測定した。抗体を使用前に -40°C で少量のアリコート(0.01mg/ml)として貯蔵した。5倍に濃縮したマウスIgG対照(0.05mg/ml)(カリフォルニア州、マウンテン・ビュー#9040にあるベクトン・ディキンソン)を使用した。使用時に、これをHEPES緩衝液中で1:5に希釈した。第二抗体はFITCに結合されたヤギ抗マウスIgG(カリフォルニア州、バーリングゲーム#3506にあるタゴ(TAGO))であった。これを -20°C で少量のアリコートとして貯蔵した。フォルボールミリスレートアセテート(PMA)(ミズーリー州、セントルイスにあるシグマ(Sigma))を -40°C で貯蔵した。使用時に、これをDMSOに溶解した(処理濃度は 1.62×10^{-5} Mであった)。

16%のパラホルムアルデヒド(PFA)(ミズーリー州、セントルイスにあるシグマ)を、パラホルムアルデヒド16gを脱イオン水100mlに添加することにより調製した。これを 70°C に加熱し、その後その溶液が透明になるまで3MのNaOHを滴下して添加した。その溶液を冷却し、pHを1NのHClで7.4に調節した。これを濾過し、貯蔵した。市販の等張緩衝液：ヘマトール・アイソトニック・ディリユエント(Hemata11 Isotonic Diluent)(フィッシャー(Fisher)#CS 606-20)を使用した。

血小板濃厚液の血小板活性化を測定するために、ヒト血小板のユニットをアラメダーコントラ・コスタ・メディカル・アソシエーションの血液バンクから得た。アリコート5mlをバッグから取り出し、対照(これは照射室中に入れられること以外の処理を受けなかった)を除いて、特定量のUVA照射を受けた。血小板濃厚液を循環水浴に取り付けられた栓付きガラス製水ジャケット室に入れることにより温度を照射中 25°C に保った。照射装置(デルマ・コントロール、ドルトン、

III. ; 型番号1224-スペシャル)は、上記の実施例3に記載されたとおりであった。照射後、血小板を5日間貯蔵した。特定の時点で、アリコートを取り出し、処理した。

処理は血小板濃厚液のアリコート（例えば、5マイクロリットル）を抗体および適当な試薬を含むそれぞれの微小遠心分離管に添加することを伴い、そしてこれを非常に穏やかにボルテックス混合した。試料を室温で15分間インキュベートした。

ヤギ抗マウス IgG-FITC (HEPES緩衝液中1:10に希釈)をそれぞれの管に添加し(5 μ l)、その溶液を穏やかなボルテックスにより混合した。試料を室温で更に15分間インキュベートした。

イソトン(Isoton)II (1 ml) をそれぞれの管に添加し、ポリプロピレン製の使い捨てピペットで穏やかに混合した。HEPES(150マイクロリットル)中8%のPFAをそれぞれの希釈試料に最終1%となるように添加した。血小板をFACSCANで分析した。結果を表3に示す。

表 3

条件	3 日目		5 日目	
	未活性化	PMA 活性化	未活性化	PMA 活性化
対照	17	85	25	89
UV5'	17	87	24	86
UV10'	51	84	77	79

活性化は%として表される。明らかに、10分間の照射(UV10')は貯蔵血小板にかなりの負の影響を生じた。血小板が高度に活性化された。対照的に、5分間の照射(UV5')は、照射を受けなかった対照以上に有意な活性化を生じなかった。

実施例 7

実施例 6 の結果が与えられたとすると、短い照射時間またはフィルターの使用がUV照射による細胞の損傷を避けるために必要とされることが明らかである。こ

の実施例において、CD62を使用して血小板活性化に関するプロテリンの存在下の照射の影響を測定する。短い照射時間および波長フィルターを別々に使用する。

短い照射時間： ヒト血小板のユニットを再度アラメダーコントラ・コスト・メディカル・アソシエーションの血液バンクから得た。アリコート 5 ml をバッグから取り出し、対照（これは照射室中に入れること以外の処理を受けなかった）

を除いて、 $10\mu\text{g/ml}$ の8-MOPの存在下で5分間(5')のUVA照射を受けた。血小板濃厚液を循環水浴に取り付けられた栓付きガラス製水ジャケット室に入れることにより温度を照射中 25°C に保った。照射装置(デルマ・コントロール、ドルトン、I11.; 型番号1224-スペシャル)は、上記の実施例3に記載されたとおりであった。

照射後、血小板を実施例6のように再度5日間貯蔵した。特定の時点で、アリコートを取り出し、CD62抗体で検定し、そしてFACSCANで分析し、これらの条件下では、細胞に損傷を与えないで血小板を不活化でき、かつ輸血の前に5日間貯蔵できることがわかった。

波長フィルター: $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ の水溶液を NiSO_4 と組み合わせて使用して、使用した光源の発光スペクトルの 365nm 成分を実質的に除去した。そのCo-Ni溶液は、照射中に冷媒として水に代えて都合良く使用し得る。

フィルターを用いる10分間の照射後に、血小板を貯蔵し、そしてFACSCANでCD62抗体で分析した。これらの条件下では、細胞に損傷を与えないで血小板を不活化でき、かつ輸血の前に5日間貯蔵できることがわかった。

以上は説明の目的のためにのみ示されたものであり、この出願の発明の範囲を限定することを目的とするものではなく、本発明の範囲は下記の請求の範囲に特定されたとおりである。

【図1】

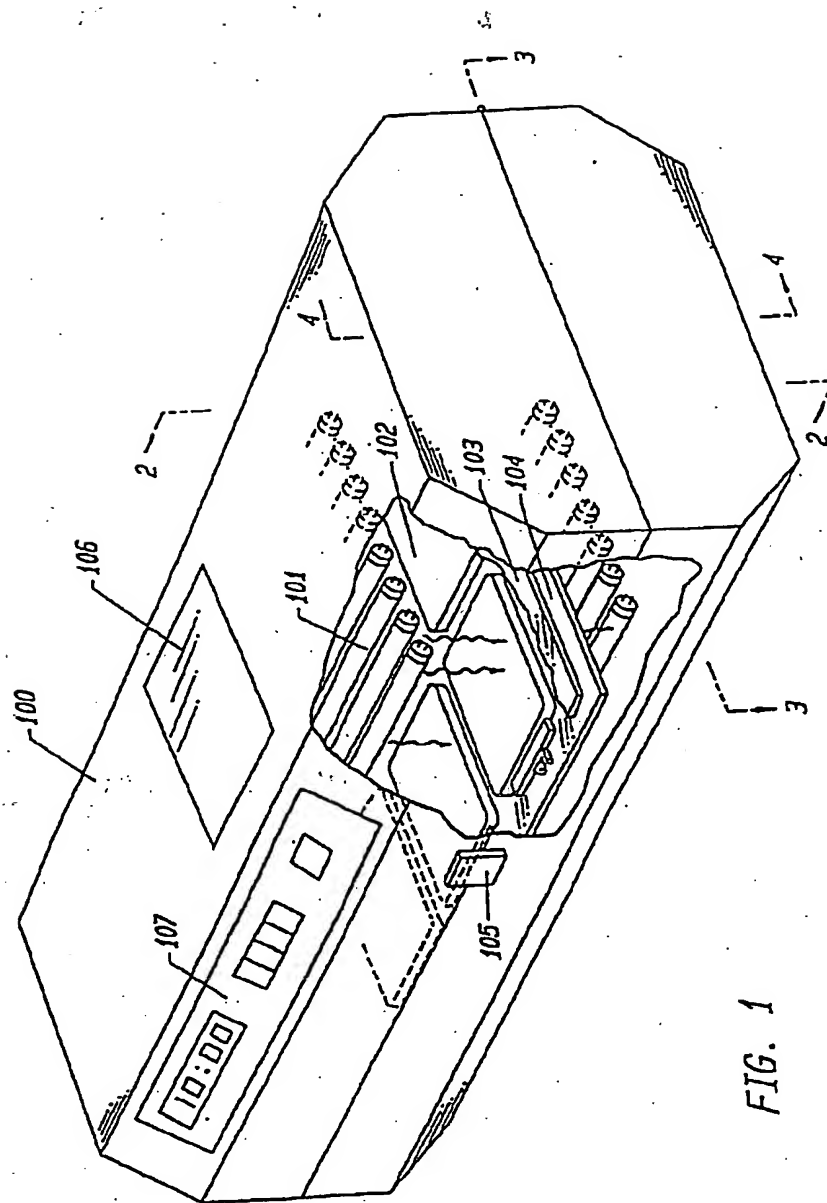


FIG. 1

【図3】

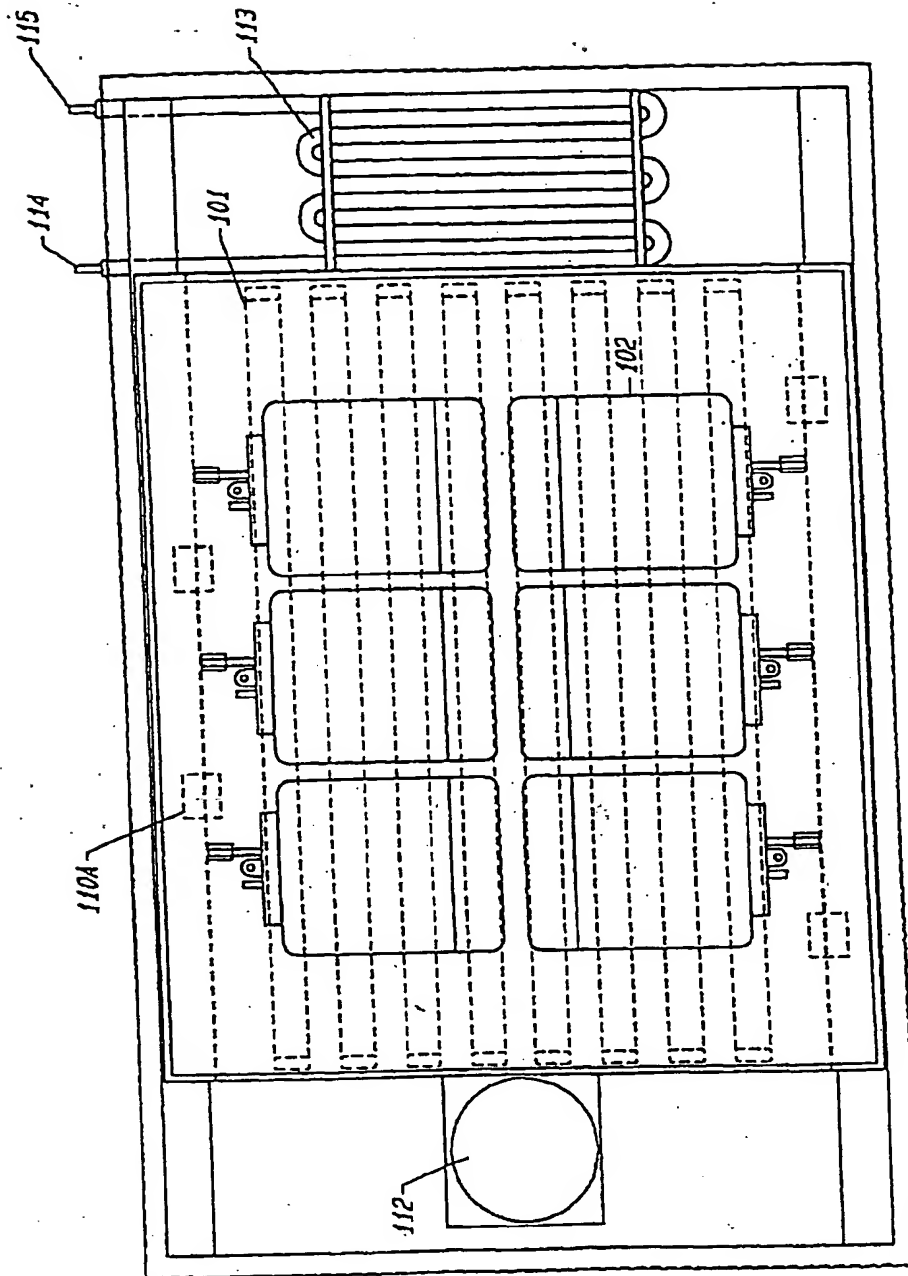


FIG. 3

【図4】

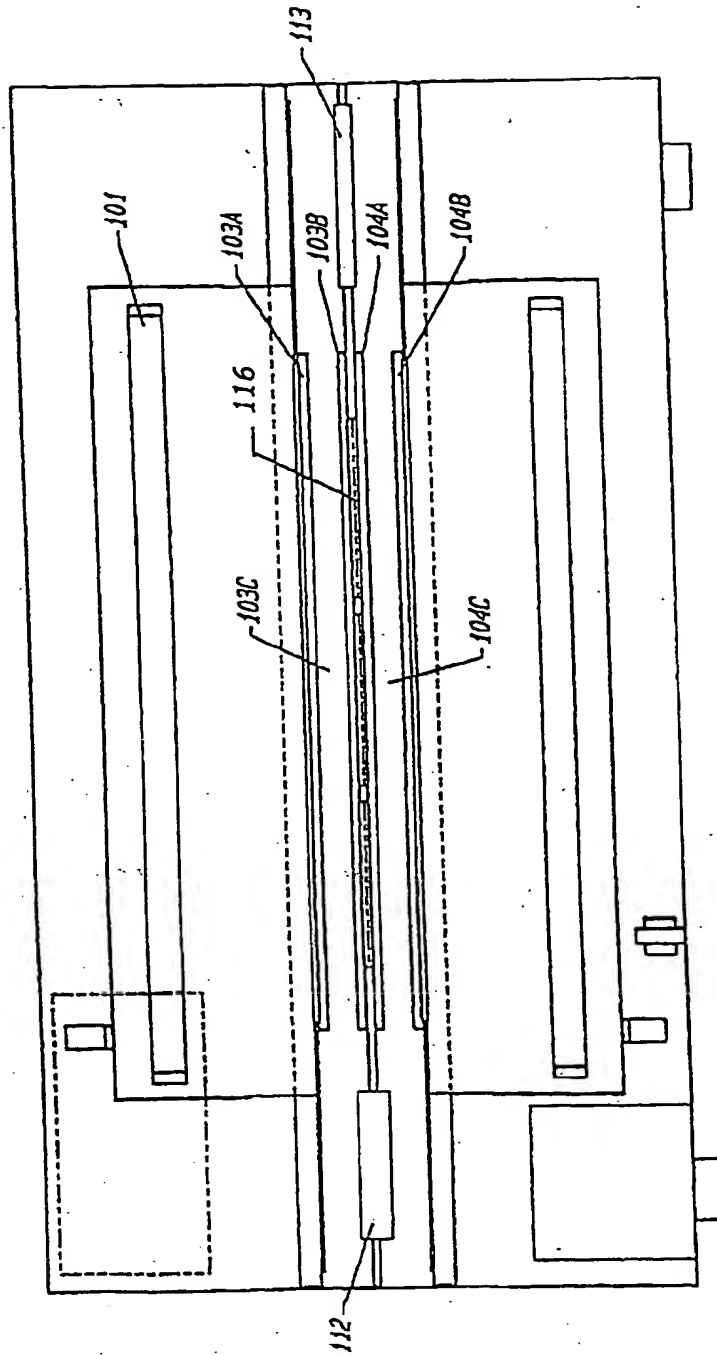


FIG. 4

【図5】

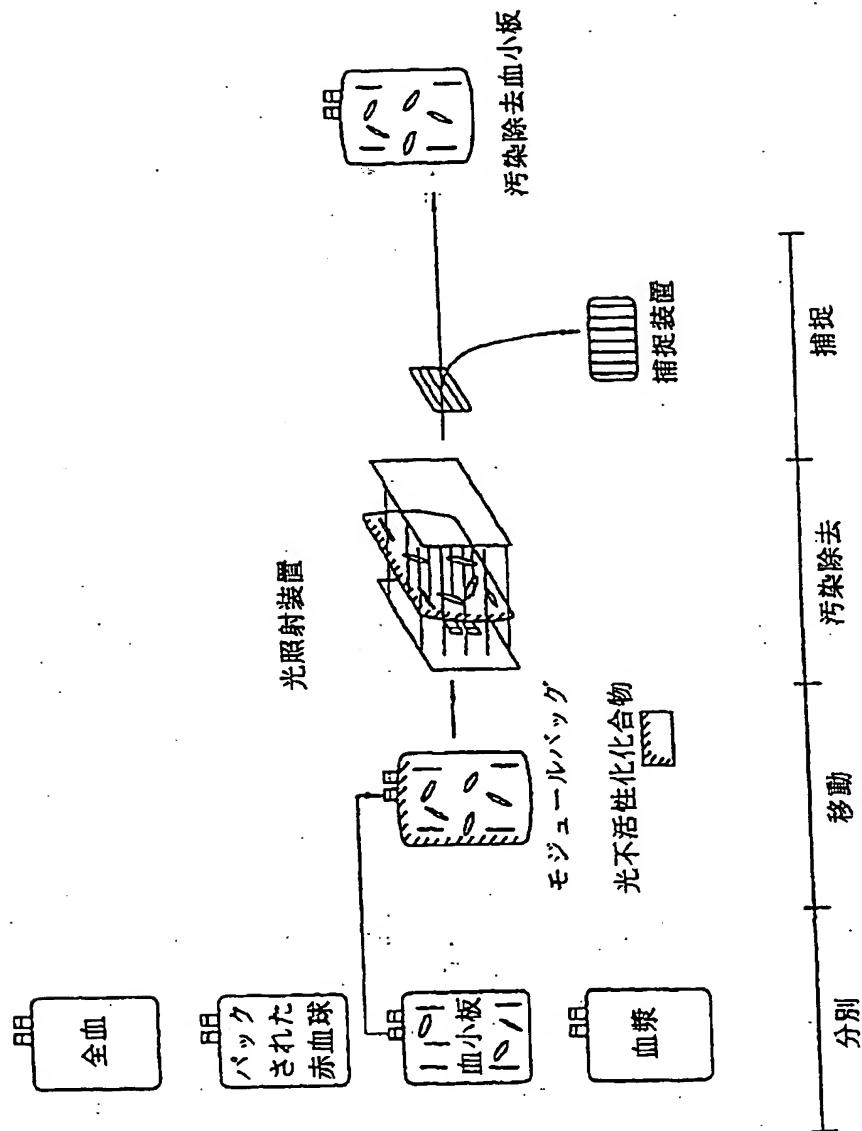
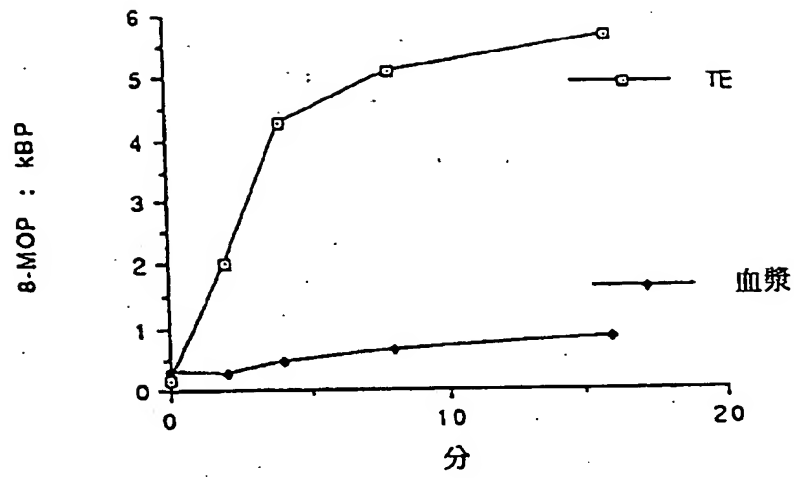


FIG. 5

【図6】

FIGURE 6



【図7】

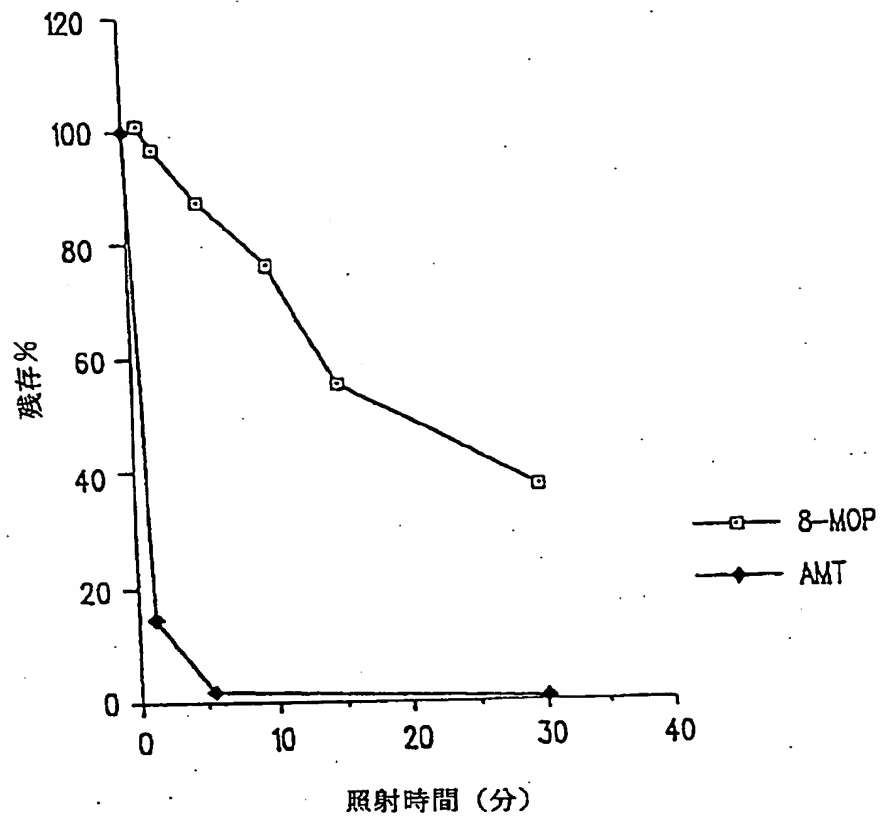


FIG. 7

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US94/12764

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) : Please See Extra Sheet.

US CL : Please See Extra Sheet.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 250/455.11, 461.1, 492.1; 422/24, 44; 424/90, 329; 433/2; 604/4, 5, 6

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CHEM ABSTRACTS, BIOSIS, MEDLINE, APS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US, A, 5,030,200 (JUDY ET AL.) 09 JULY 1991, see entire document.	1-40
Y	US, A, 4,613,322 (EDELSON) 23 SEPTEMBER 1986, see columns 13 and 14.	1-40
Y	US, A, 4,692,138 (TROUTNER ET AL.) 08 SEPTEMBER 1987, see columns 2, 6, 7 8, 10.	3, 4, 20-30, 33-40
Y	Blood, Volume 74, Number 1, issued July 1989, L. Lin et al., "Use of 8-Methoxypsoralen and Long-Wavelength Ultraviolet Radiation for Decontamination of Platelet Concentrates," pages 517-525, see page 518.	1-40
Y	US, A, 4,866,282 (MIRIPOL ET AL.) 12 SEPTEMBER 1989, see columns 2-4.	13-15, 31-32

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"B" earlier document published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which very closely describes an priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified)	"A" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

28 DECEMBER 1994

Date of mailing of the international search report

JAN 23 1995

Name and mailing address of the ISA/US
Commissioner of Patents and Trademarks
Box PCT
Washington, D.C. 20231

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

RALPH GITOMER

Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet)(July 1992)*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US94/12764

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
IPC (G):

A01N 1/02; A61L 2/08; A61M 1/38; A61K 41/00; H01J 37/20; G01N 21/64

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
US CL :

250/455.11, 461.1, 492.1; 422/24, 44; 424/90, 529; 435/2; 604/4, 5, 6

フロントページの続き

(51)Int.Cl. [°]	識別記号	片内整理番号	F I		
A 6 1 M 1/02		7720-4C	A 6 1 M 1/02		
1/36	5 3 5	7720-4C	1/36		5 3 5